

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 52

SEPTIEMBRE 2002

Nº 3

Contenido

Páginas

ARTICULOS GENERALES

- Acido fitico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas**
Beatriz Martínez Domínguez, M^a Victoria Ibáñez Gómez y Francisco Rincón León..... 219
- Actualización en la farmacología de *Spirulina (Arthrospira)*, un alimento no convencional**
Germán Chamorro, María Salazar, Katia Gomes de Lima Araújo, César Pereira dos Santos,
Guillermo Ceballos y Luis Fabila Castillo 232
- Crenças sobre as vitaminas e consumo de produtos vitamínicos entre universitários de São Paulo**
Karina Maria Olbrich dos Santos, Antônio de Azevedo Barros Filho..... 241
- Modelo biológico para la detección de antígenos alimentarios**
Norberto Bassan, Miguel Vinuesa, Stella Roma y Fernando Pérez 249
- ¿Qué es envejecer?**
José María Bengoa 257

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Nutrición Humana

- Perfil de lípidos y lipoproteínas en inmigrantes chinos residentes en Costa Rica**
Ileana Holst, Rafael Monge-Rojas, Rita Ma. Marín, Karol Hidalgo, Mónica Kelly 261

Nutritional supplementation according to energy and protein requirements in malnourished HIV-infected patients Victor Charlin, Fernando Carrasco, Cecilia Sepúlveda, María Torres, Juan Kehr	267
Consumo de Alimentos	
Consumo de harina de maíz precocida y su aporte de hierro y vitamina A en preescolares de bajos recursos económicos Sara del Real, María Concepción Páez, Liseti Solano, Zuleida Fajardo	274
Microbiología de Alimentos	
<i>Listeria monocytogenes</i> en vegetales mínimamente procesados María Luisa de Curtis, Olgamar Franceschi y Norma De Castro	282
Ciencias de Alimentos	
Propiedades funcionais de material colagenoso de pés de frango Sandra Geres Tavares Alves, Sandra Helena Prudencio-Ferreira	289
Adaptabilidad de mazorcas de híbridos de maíz super dulce al procesamiento industrial. I congelación Braunnier Alfonso, Candelario Camacho, Ligia Ortiz de Bertorelli y Frank De Venanzi	294
Efecto de la alta presión hidrostática (APH) en la imbibición de agua, tiempos de cocción y microestructura del <i>Phaseolus vulgaris</i> Elba Sangronis, Albert Ibarz, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Barry G. Swanson	301
Tecnología de Alimentos	
Calidad nutricional y aceptabilidad de un producto formulado con carne de pollo deshuesada mecánicamente, plasma y glóbulos rojos de bovino Betty Benítez, Anangelina Archile, Lisbeth Rangel, Mariela Bracho, Maigualida Hernández y Enrique Márquez	307
NUEVOS LIBROS	313
INFORMACION PARA LOS AUTORES	314

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 52

SEPTEMBER 2002

Nº 3

Contents

Pages

GENERAL ARTICLES

Nutritional and analytical implications of phytic acid

Beatriz Martínez Domínguez, M^a Victoria Ibáñez Gómez and Francisco Rincón León..... 219

Update on the pharmacology of *Spirulina (Arthrospira)*, an unconventional food

Germán Chamorro, María Salazar, Katia Gomes de Lima Araújo, César Pereira dos Santos,
Guillermo Ceballos and Luis Fabila Castillo 232

Vitamin beliefs and consumption of vitamin supplements among university students in the city of São Paulo

Karina Maria Olbrich dos Santos, Antônio de Azevedo Barros Filho..... 241

Biological model for detection of food antigens

Norberto Bassan, Miguel Vinuesa, Stella Roma and Fernando Pérez 249

¿What is aging?

José María Bengoa 257

RESEARCH PAPERS

Human Nutrition

Lipid profile of Chinese immigrants living in Costa Rica

Ileana Holst, Rafael Monge-Rojas, Rita Ma. Marín, Karol Hidalgo, Mónica Kelly 261

Nutritional supplementation according to energy and protein requirements in malnourished HIV-infected patients	
Victor Charlin, Fernando Carrasco, Cecilia Sepúlveda, María Torres, Juan Kehr	267
Food Consumption	
Corn flour intake and its contribution of iron and vitamin A in low income preschoolers	
Sara del Real, María Concepción Páez, Liseti Solano, Zuleida Fajardo	274
Food Microbiology	
<i>Listeria monocytogenes</i> in vegetables minimally processed ready-to-use	
María Luisa de Curtis, Olgamar Franceschi and Norma De Castro	282
Food Science	
Functional properties of collagenous material from chicken feet	
Sandra Geres Tavares Alves, Sandra Helena Prudencio-Ferreira	289
Super sweet corn adaptability for industrial freezing process	
Braunnier Alfonzo, Candelario Camacho, Ligia Ortiz de Bertorelli and Frank De Venanzi	294
Effect of high hydrostatic pressure on water imbibition, cooking times and microstructure of <i>Phaseolus vulgaris</i>	
Elba Sangronis, Albert Ibarz, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Barry G. Swanson	301
Food Technology	
Nutritional quality and acceptability of a product formulated with mechanically deboned poultry meat, plasma and bovine red cell	
Betty Benítez, Anangelina Archile, Lisbeth Rangel, Mariela Bracho, Maigualida Hernández and Enrique Márquez	307
NEW BOOKS	313
INFORMATION FOR AUTHORS	314

Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas

Beatriz Martínez Domínguez, M^a Victoria Ibáñez Gómez y Francisco Rincón León

Universidad de Córdoba-Córdoba, España

RESUMEN. Este artículo proporciona una revisión del estado actual de los conocimientos existentes sobre el ácido fítico (AF) en relación a varios aspectos. Se incluyen datos en relación a su estructura química y sus propiedades fisicoquímicas, su presencia en numerosos cereales y leguminosas y su papel en la planta. Además, se discuten otros aspectos como el significado nutricional del AF en relación a su capacidad de quelar proteínas y minerales, sus efectos beneficiosos para la salud y los métodos más comúnmente utilizados en su determinación.

Palabras clave: Acido fítico, antinutrientes, proteínas, mineral, biodisponibilidad, cereales, leguminosas, métodos de análisis.

SUMMARY. Nutritional and analytical implications of phytic acid. This review provides a current summary of the literature concerning various aspects of phytic acid. These include data relative to its chemical structure and physicochemical properties, its occurrence in numerous cereals and legumes, and its role in plants. In addition, the nutritional significance of phytate with regard to its protein and mineral binding abilities, its health benefits and the methods commonly used for the analysis of phytate are discussed.

Key words: Phytic acid, antinutrients, proteins, mineral, bioavailability, cereals, legumes, analytical methods.

INTRODUCCION

El ácido fítico (AF) y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en semillas de cereales y leguminosas (1,2). Sin embargo, en esta forma el P permanece no disponible para el hombre y animales monogástricos (3,4), debido a que éstos no están provistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato (5). El AF es además un compuesto con actividad antinutricional, debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales y proteínas (2,6) convirtiéndolos en no asimilables por el organismo bajo condiciones fisiológicas (7-9). Paradójicamente, el AF, a bajas dosis, presenta también efectos positivos sobre la salud como son su acción protectora frente al cáncer, reducción de la formación de cálculos renales y prevención de enfermedades cardiovasculares (10).

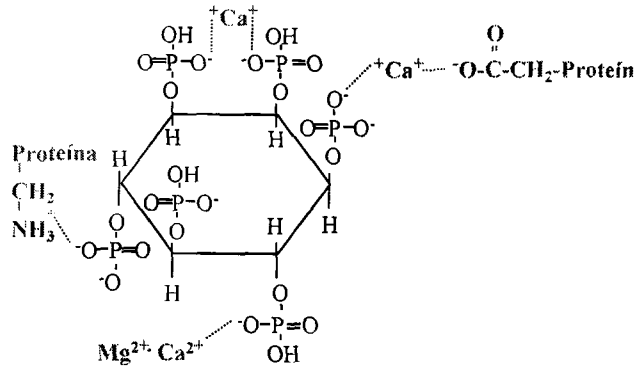
En los últimos años, la divulgación dada a los potenciales efectos beneficiosos de dietas bajas en grasas y con alto contenido de fibra, ha supuesto un fuerte empuje en el uso de leguminosas y semillas en grano en la alimentación humana (11). Estos cambios en los hábitos alimentarios hacia una alimentación rica en fibra han conducido a una mayor ingesta de fitatos en la dieta (12). No obstante, es importante considerar que durante el procesado de los alimentos y la digestión, la cantidad final de AF disminuye significativamente (13) como consecuencia de su hidrólisis, enzimática o química, en inositol fosfatos con un menor grado de fosforilación (InsP5 - InsP) (2,14). Uno de los principales

problemas encontrados en la interpretación de los datos existentes sobre el AF en la bibliografía es el derivado de la variabilidad de resultados asociada a la utilización de diferentes procedimientos analíticos para su determinación. En la actualidad, dado que los efectos del AF y sus derivados desfosforilados en la nutrición humana son diferentes, aquellos métodos que permiten su separación son considerados los más adecuados (2,14).

Estructura química y propiedades

Se han propuesto varios modelos para la estructura del AF. Según el modelo propuesto por Anderson (15), el AF sería una molécula con seis grupos ortofosfato (InsP6), de nombre químico *myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexaquis (dihidrógeno fosfato) (16-18). Según esta estructura, el AF, a pH neutro y al pH que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada negativamente y por tanto muy reactiva, por lo que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a moléculas cargadas positivamente como cationes o proteínas (19). La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato: éstos pueden unirse bien a un sólo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de AF (Figura 1) (18,20). En la semilla el AF se encuentra como una mezcla de sales con varios cationes como K, Mg, Ca, Mn, Zn y Fe (21); el término fitina se ha empleado para designar una mezcla de sales de Ca y Mg del AF (22,23).

FIGURA 1
Interacciones del AF con proteínas y minerales (18)



La "insolubilidad" del AF es la principal causa de su comportamiento antinutricional y de sus propiedades fisicoquímicas (16,24). Sin embargo, es importante considerar que la solubilidad de las sales del AF varía con el pH, ya que el grado de protonación de los grupos fosfato que no se han unido a los metales está en función de dicho parámetro (25). Aparentemente, en la semilla el AF se encuentra como sales relativamente solubles de Na o K más que como fitina insoluble (26). Las sales de Ca y Mg son solubles a pH bajos e insolubles a pH elevados, por lo tanto a pH fisiológico serían insolubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral. En general, las sales hidrogenadas y monovalentes del AF son solubles en agua, mientras que las sales metálicas divalentes y trivalentes son bastante insolubles (27).

El grado de interacción entre AF y proteínas es dependiente de la carga neta de la proteína, de su conformación y de las interacciones con minerales a un pH dado (18,28,29). A bajo pH, por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran cargadas positivamente y el AF negativamente. En estas condiciones, se produce una fuerte interacción electrostática entre grupos amino terminal de las proteínas, y ésteres fosfato aniónicos del AF, formándose un complejo binario (16, 18) (Figura 1). A pH intermedio, por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, dado que la carga de las proteínas al igual que la del AF es negativa, su interacción sería imposible, sin embargo si puede realizarse a través de la formación de un complejo ternario con cationes divalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} (Figura 1). Esta unión se realiza a través de los grupos carboxilos ionizados y el grupo imidazol desprotonado de la histidina, siendo necesaria una concentración mínima de estos cationes para mantener estos complejos (18). A pH intermedio también pueden existir algunos complejos binarios, ya que a dicho pH los residuos lisil y arginil de las proteínas están aún cargados positivamente. A pH elevado la interacción entre las proteínas y el AF disminuye, los grupos lisil y arginil

pierden su carga, y por tanto su capacidad de formar complejos binarios. Los complejos ternarios se desestabilizan ya que la fuerza iónica aumenta a pH elevado; un incremento en la concentración del ión Na hace que la reacción de equilibrio del complejo ternario se desplace hacia la derecha liberándose fitato cálcico insoluble y proteína-Na soluble (Figura 1) (16,18). Como hemos visto la formación de complejos entre AF y proteínas no sólo afecta a la solubilidad y propiedades funcionales de las mismas, sino que también tiene una gran influencia en la biodisponibilidad mineral (30). Además, el AF puede unirse también al almidón, bien directamente a través de puentes de hidrógeno o indirectamente mediante las proteínas a las que se asocia (29).

Distribución, localización y contenido

El AF se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal. En la mayoría de las plantas una gran proporción de P (80%) está presente en forma de fitato (6,31), especialmente en aquellas semillas en las que el AF se encuentra en concentraciones elevadas, desde 1-7% (2,32). Así, en las semillas de cereales, oleaginosas y leguminosas los niveles de AF son elevados y constituyen el mayor porcentaje (60-82%) del P total; varias raíces y tubérculos presentan cantidades moderadas de AF, siendo el P fítico el 21-25% del total, mientras que en verduras las cantidades de AF encontradas son muy pequeñas (5,33).

En cereales el P fítico constituye el 64-85% del P total (33), localizándose la mayoría del AF en aleuronas celulares (21,34). Los niveles de AF (g/100g) encontrados en el arroz entero (*Oryza sativa*) oscilan desde un 0,86-0,99%, localizándose el 80% del fitato en la capa externa del salvado; en el trigo (*Triticum aestivum*) la localización es similar a la del arroz y los valores mayores: 1,13%; en el maíz (*Zea mays*) el AF representa de 0,77-0,99%, y de éste más del 90% se encuentran en el germen (16,33,35). En el sorgo (*Sorghum vulgare*) se han encontrado valores de 0,82-0,96% siendo los niveles de AF mayores en las variedades coloreadas (33). En la cebada (*Hordeum vulgare*) y en la avena (*Avena sativa*) los niveles de AF obtenidos son del 0,99% y 0,77%, respectivamente (16).

En la mayoría de las semillas de leguminosas el P fítico constituye aproximadamente el 80% del P total, y se localiza fundamentalmente en el cotiledón y ejes embrionarios (36). Estructuralmente su localización no es bien conocida; según algunos autores está integrado con el cuerpo de proteínas formando complejos con proteínas o minerales (2), sin embargo otros investigadores han indicado que en judías más del 70% del fitato se encuentra en formas solubles en agua, posiblemente combinadas con proteínas solubles, más que como fitina insoluble (9,37). En habas (*Vicia faba*) los niveles de AF oscilan entre 0,71-1,15% (38), localizándose

fundamentalmente en el cotiledón, mientras que la cáscara contiene tan sólo del 0,06-0,20% del AF (39). El contenido de AF del guisante (*Pisum sativum*) es del 0,75-0,94% (38). En el frijol de vaca (*Vigna unguiculata*) el AF constituye un 0,77% (35). En lentejas (*Lens culinaris*) y garbanzos (*Cicer arietinum*) los niveles de AF son similares, aproximadamente un 0,7% (33).

En la soja (*Glycine max*) el AF constituye el 1,5% del peso total del cotiledón, y un gramo de soja contiene aproximadamente 4 mg de fitato que representan el 57% del P orgánico y el 70% del P total, este fitato se encuentra uniformemente distribuido en el cotiledón, probablemente como fitato potásico soluble (16, 40, 41). En otras semillas oleaginosas, como girasol (*Helianthus annuus*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y algodón (*Gossypium herbaceum*), el AF se encuentra en subestructuras de tipo cristaloides o globoide que al parecer no existen en la soja (16). En general, en las harinas de semillas oleaginosas el P fítico es el 60-77% del total, siendo los niveles de AF muy elevados, desde 1,7% en la harina de cacahuete hasta 4,8% en la de semilla de algodón (16,33).

Función fisiológica en la planta

Entre las funciones fisiológicas que se le han atribuido al AF se encuentran: depósito de P, depósito de energía, fuente de cationes o iniciador de la latencia (16). Además, algunos metabolitos procedentes del *myo*-inositol y del inositol monofosfato (InsP) juegan un papel importante en el desarrollo de la planta (42). Raboy *et al.* (43,44) han realizado una descripción detallada de la síntesis y metabolismo del AF y los *myo*-inositol fosfatos en la planta.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto un incremento en la acumulación de AF con la maduración de la semilla. Aunque dicha acumulación ha sido interpretada por algunos autores como una manera de prevenir niveles excesivamente altos de P inorgánico durante la maduración, la mayoría coincide en que su función principal es el almacenamiento de P (24). En la semilla, el AF constituye el principal almacén de P inorgánico, en forma de fosfatos y *myo*-inositol, así como de determinados cationes, como el Mg^{2+} que son movilizados durante la germinación para la síntesis de ácidos nucleicos (23,33,45), además el *myo*-inositol es un importante precursor de los polisacáridos de la pared celular (46) y de fosfolípidos incluidos en la señal de transducción (47). Por otro lado, la capacidad antioxidante del AF hace que éste contribuya a aumentar el tiempo de latencia de la semilla, ya que previene la peroxidación de lípidos (48), y se ha visto que inositoles metilados participan en la osmoprotección en plantas halofílicas (49).

La regulación de la acumulación de AF durante el desarrollo de la semilla no es totalmente conocida, parece ser que se lleva a cabo mediante un control genético en el

que participan numerosos genes (50, 51). Altas concentraciones de AF en semilla de soja aparecen como paralelas a mayores concentraciones de P en la hoja, y ambas están relacionadas de una manera compleja determinada tanto por factores ambientales (influyen en la cantidad de P disponible), como genotípicos (influyen en la absorción de P), de modo que determinan el suministro de P durante la germinación (52).

Numerosos investigadores han encontrado una reducción del AF durante la germinación en las semillas de leguminosas, aparentemente como resultado de un elevado aumento de la actividad fitasa (14,30,53-56). La enzima fitasa (*myo*-inositol-*hexakis*fosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), que cataliza la hidrólisis del AF en *myo*-inositol, *myo*-inositol fosfatos y fosfatos inorgánicos (21) está ampliamente distribuida en plantas, tejidos animales y en numerosas especies de mohos (9,57). Las semillas presentan tanto actividad fitasa constitutiva, así como enzimas fitasa que son sintetizadas "de novo" durante la germinación (58). La actividad fitasa intrínseca depende del tipo de alimento vegetal que se considere (59), no obstante la mayoría de las fitasas de las semillas se encuadran dentro de las fosfatasas ácidas no específicas, teniendo un pH óptimo de 4-5.6. Por el contrario la actividad fitasa adicional, que se localiza a nivel subcelular en el cuerpo de proteínas en aleuronas de cereales y está asociada a las membranas de los orgánulos corpusculares de almacenamiento de fitina, se produce a pH alcalino (46).

Significado nutricional y fisiológico

El AF se encuentra en los alimentos en niveles del 0,1-6% (60,61), dependiendo su concentración de la parte de la planta que se consuma: en semillas los niveles son elevados, en tubérculos, raíces y frutas moderados, y en verduras bajos (33). En países subdesarrollados y en vías de desarrollo, así como en la población vegetariana de países desarrollados, el consumo de alimentos con altos niveles de AF es muy elevado (1,62,63). El consumo medio de AF en la dieta se ha estimado en 0,75-0,79 g/persona/día, siendo estos niveles 2 ó 3 veces mayores en países en vías de desarrollo como la India (62).

Efectos antinutricionales

Los fitatos reducen la biodisponibilidad mineral e inhiben enzimas proteolíticas y amilolíticas (62,64). A pesar de que la naturaleza exacta y el grado de unión del AF a minerales y proteínas son difíciles de determinar, y su papel en la nutrición es complejo (65), sí está claro que altos niveles de AF en la dieta están asociados con efectos nutricionales adversos en el hombre (62).

Efectos en la proteína

La interacción del AF con las proteínas ha sido ampliamente estudiada, principalmente en soja, sin embargo

su naturaleza no es totalmente conocida y los efectos antinutricionales en la disponibilidad de dichas proteínas no están aun claros (26,38).

La existencia de una correlación negativa ($p < 0,05$) entre el AF y la digestibilidad proteica ha sido puesta de manifiesto en varios alimentos (64,66-69). Sin embargo en varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre el efecto del fitato en la digestibilidad de las proteínas queladas y la absorción de aminoácidos, el efecto adverso del fitato es o muy pequeño o nulo (70-73). Anderson (74) ha revisado la interacción entre AF y proteínas, encontrando resultados discordantes en los experimentos *in vivo* en lo referente a ingesta de fitato y digestibilidad proteica. La causas de estas discrepancias puede ser la diferente naturaleza de la fuente de proteínas (38). Otros investigadores han atribuido el efecto negativo de los fitatos en el metabolismo proteico más que a la formación de un complejo fitato-proteína a la capacidad de inhibir enzimas digestivas (26). Es conocido que el AF inhibe α -amilasa de diferentes orígenes, tripsina, tirosinasa y pepsina (57). Que el fitato inhiba enzimas como la pepsina no es extraño, ya que al pH ácido al cual ésta es activa se promueven fuertes uniones electrostáticas entre ambos; lo mismo ocurre con aquellas enzimas que tienen un pH óptimo ácido (26). A diferencia de lo que ocurre con la pepsina, la interacción con la tripsina y la quimiotripsina no sólo depende del pH, sino también de otros factores entre los que se encuentra la relación proteína/fitato. A pH 3 el fitato forma complejos insolubles tanto con la tripsina como con la quimiotripsina, sin embargo a pH 7,8, en el que la actividad de estas enzimas es algo mayor, es necesario el Ca^{2+} para la formación estos complejos, no obstante las condiciones a la que se producen fuertes interacciones rara vez se dan *in vivo* (26). Varios estudios han mostrado claramente que aunque la digestibilidad de la proteína, y por lo tanto la absorción de aminoácidos, es solamente marginalmente mayor en dietas con bajo contenido en fitato, las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas (75-77).

Una cuestión clave a tener en cuenta para entender el efecto antinutricional del AF sería conocer cuanto fitato está aun disponible tras el procesado. Si consideramos la fuerte afinidad del AF hacia varios cationes y el tipo de interacciones que supone su asociación con proteínas de la dieta, así como el efecto del procesado de los alimentos, la degradación térmica de los ésteres inositol y el pH, habría que esperar que quedara poco fitato libre que interaccionara con enzimas y sistema digestivos para causar una influencia significativa (26). Por otro lado hay que tener en cuenta que estudios anteriores han mostrado que en presencia de minerales como Ca^{2+} o Mg^{2+} , la inhibición *in vitro* de las enzimas podría ser mucho menor (78). Existen también evidencias de que el complejo fitato-proteína es menos susceptible a la digestión proteolítica que la proteína sola, sin embargo es lógico que

las proteínas en las cuales alguna cadena lisil o arginil están queladas por el fitato, no sean efectivamente hidrolizadas por la tripsina, en estas condiciones serían más efectivas enzimas como la quimiotripsina que muestra gran afinidad por las cadenas hidrofóbicas (26).

Dado que la interacción fitato-proteína y su efecto en la digestibilidad proteica se produce bajo una amplia gama de condiciones, y tanto las condiciones simuladas *in vivo* como los resultados obtenidos son limitados, el estudio de los efectos adversos de los fitatos en la nutrición debería ser dirigido exclusivamente hacia el punto de vista de la biodisponibilidad mineral (26).

Efectos en la biodisponibilidad mineral

Por su estructura altamente reactiva, el AF es un excelente agente quelante presentando gran afinidad por todos los elementos trazas polivalentes y minerales como Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Mg^{2+} y Ca^{2+} (6,40,45,79-82). La mayor parte de los estudios realizados sobre la interacción entre el fitato y los minerales ponen de manifiesto la existencia de una relación inversa entre la absorción de estos micronutrientes y el AF, aunque existen grandes diferencias en el comportamiento individual de cada elemento mineral (16).

Los efectos adversos del AF en la biodisponibilidad mineral dependen de un gran número de factores entre los que se destacan la concentración de AF y la fuerza de su unión con los diferentes minerales (29). También influyen otros factores como (16,29,83-86): (a) las condiciones de procesado del alimento (especialmente el pH), así como el tipo de AF (añadido o endógeno) y la concentración de minerales en dicho alimento, (b) si el AF es ingerido en la misma comida que la fuente mineral o en comidas separadas, (c) la concentración de proteínas de la dieta, y por tanto la presencia de proteínas, péptidos o aminoácidos en el intestino que pueden interferir en la formación del complejo fitato-mineral, (d) la presencia de otros agentes quelantes como fibra dietética, ácido oxálico, ácido ascórbico, ácido cítrico o taninos, que pueden competir con el AF en su unión con minerales, (e) la presencia de fitasa de origen intestinal, bacteriana o de la dieta, así como la inhibición de dicha enzima, y (f) la adaptación metabólica del individuo a altos niveles de AF. Zhou y Erdman (2) y Plaami (87) han revisado el efecto del AF en distintos minerales.

Calcio

Estudios realizados en el hombre indican que el AF reduce la absorción de Ca (88), y que la disminución del AF en la soja mediante mejora genética, supone un incremento en la biodisponibilidad de este mineral (89). Por el contrario, los resultados obtenidos en ratas son contradictorios: algunos estudios indican la existencia de un efecto inhibitor del AF

en la absorción de Ca (90,91), mientras en otros no se obtiene efecto significativo alguno (79,92-94). Por otra parte se ha sugerido que las ratas no pueden ser consideradas como un buen modelo para la absorción de Ca debido a la actividad fitasa de su mucosa intestinal, que en el hombre (si existe) no juega un papel importante en la digestión del AF (89).

Lonnerdal *et al.* (90) han indicado que el efecto inhibitor del fitato depende del grado de fosforilización del inositol, cuando es elevado (5 ó 6 fosfatos) la absorción del Ca y Zn es inhibida significativamente, sin embargo a niveles de fosforilización menor este efecto no se observa. La solubilidad de los complejos formados depende también de la razón fitato-Ca; así la solubilidad del complejo fitato-Ca, es extremadamente baja a razones 1/8, pero a otras es alta (81). Cuando el Ca está presente en concentraciones elevadas se forman complejos con 5 ó 6 cationes por molécula de fitato ($[Ca]_5$ -fitato o $[Ca]_6$ -fitato) (25). También pueden existir otros complejos que incluyen de uno a 4 cationes unidos a una molécula de fitato, dependiendo de la concentración de Ca presente; los complejos hexa-, penta-, tetra-, y tricalcio son insolubles mientras que los complejos mono- y dicalcio son solubles (95). No obstante, la absorción del Ca de los complejos solubles fitato-Ca es muy pobre, ya éstos que no sufren transporte pasivo en el intestino debido a la alta carga de estas moléculas (45). Por último, hacer notar que los complejos insolubles fitato-calcio son también considerados como los principales responsables de la reducción de la biodisponibilidad de otros minerales como Fe y Zn, a través de la unión de éstos al complejo fitato-Ca para formar un complejo aún menos soluble (2,86).

Hierro

Debido al importante contenido de Fe de los cereales, la mayoría de los estudios sobre la interacción entre el AF y este mineral se han realizado con el pan integral, que al mismo tiempo vehicula el AF presente en la cubierta de la semilla. A la hora de evaluar los resultados de dichos estudios es importante tener en cuenta la adición de Ca, práctica habitual en la elaboración del pan, ya que estudios sobre el balance de nutrientes tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que la adición de calcio reduce la hidrólisis del AF (11), como consecuencia de que elevadas concentraciones de dicho mineral impiden la acción de las fitasas (96). Numerosos estudios realizados en el hombre indican que el AF tiene un fuerte efecto inhibitor en la absorción de hierro (97-99). Es conocido que el salvado es un importante inhibitor del Fe, y aunque según las investigaciones realizadas por Simpson *et al.* (100) este efecto no puede ser atribuido por entero al fitato, la mayoría de los estudios coincide en que es debido exclusivamente al AF y otros inositol fosfato presentes en el salvado y no a la presencia de fibra y otros constituyentes (2,97,99). Se ha demostrado en adultos que el

efecto negativo del AF en la absorción del Fe es dosis-dependiente, pudiéndose incrementar la biodisponibilidad del Fe mediante la adición de ácido ascórbico (2,101). El ácido ascórbico no sólo facilita la solubilización del Fe de la dieta, sino que además reduce el ión férrico a ferroso, que es más soluble, y forma complejos con éstos, impidiendo por tanto su unión al AF, estos complejos Fe-ascorbato siguen siendo solubles en el intestino delgado (102).

Zinc

Numerosas investigaciones en animales de experimentación demuestran que el AF contenido en los alimentos reduce la biodisponibilidad del Zn (95,103). Los InsP6 y InsP5 son las formas de AF que ejercen este efecto, mientras que los fitatos con menor grado de fosforilación ejercen un bajo o nulo efecto en la absorción del Zn (104). Los resultados de estudios en el hombre también han demostrado que el AF presente en la dieta inhibe la biodisponibilidad del Zn, y que altos niveles de este antinutriente pueden dar lugar a una deficiencia de Zn (2). En España, las necesidades calculadas para este elemento sólo se cubren en un 68,3% (105), siendo considerado principal responsable el AF. Se ha sugerido la razón molar AF/Zn como indicador de la biodisponibilidad del Zn, y así valores de la misma mayores de 20 supondrían una disminución de la absorción de este mineral (106-108). Otros investigadores, considerando que el contenido de Ca en la dieta es de vital importancia en el efecto negativo del AF sobre el Zn (109), indican que para la predicción de la utilización del Zn sería más adecuada la razón fitato-Ca/Zn (85,110). Un aumento de la concentración de Ca en dietas que contienen Zn y fitato supone una reducción de la biodisponibilidad del Zn (95) debido a la formación de complejos insolubles Ca-fitato-Zn (2). A valores de la razón fitato-Ca/Zn mayores de 22 la utilización de Zn queda comprometida (106).

Por último señalar que cuando en un alimento confluyen diferentes constituyentes capaces de ejercer una acción antinutritiva frente a cationes, tal es el caso de oxalatos, taninos, fibra y AF, resulta complicado establecer un orden de importancia en cuanto a las fuerzas de unión que cada uno de ellos ejercen (111, 112). La mayoría de los alimentos que presentan elevado contenido de AF son también buenas fuente de fibra dietética, la cual tiene una gran afinidad por los minerales, y aunque los fitatos y la fibra son separados y evaluados independientemente en los distintos estudios, es difícil atribuir los efectos negativos en la biodisponibilidad mineral únicamente a los fitatos (33). Así pues, justificado el efecto negativo del AF sobre la biodisponibilidad mineral sería adecuada la selección genética de semillas con bajo contenido en AF, sin embargo aunque ésta supone un aumento de la eficiencia de utilización del P, lo cual es deseable,

implica una disminución de la toma de P hacia el interior del germen o la semilla que no es deseable. En cualquier caso, los programas de mejora genética han de estar dirigidos a reducir el contenido de P fítico, pero manteniendo el contenido total de P en la planta y en la semilla, así como otros constituyentes deseables (51,113).

Efectos farmacológicos

Del AF a bajas concentraciones, ha sido descrita bibliográficamente la existencia de efectos positivos, entre los que se pueden citar: retardo de la digestibilidad del almidón y disminución de la respuesta a la glucosa en sangre, hipocolesterolemia, prevención de cálculos renales, control de la caries dental y cáncer, y mejora de la capacidad de captación de oxígeno de los glóbulos rojos (2,18,32,81,114). Estudios epidemiológicos y estudios en ratas sugieren también un posible papel preventivo del AF frente a diversas patologías cardíacas, derivado del control de la hipercolesterolemia y la arteriosclerosis en el hombre (2,115,116). También se ha indicado el papel del AF como antídoto frente a la intoxicación aguda por plomo, debido principalmente a su capacidad de unirse a minerales (29,32).

La adición de AF (en niveles de 0,2-9%) en la dieta de ratas reduce significativamente los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos (117). Esto parece estar relacionado con la capacidad del AF de unirse al Zn disminuyendo los niveles séricos de Zn y la razón Zn/Cu, ya que altos valores en esta relación tienden a predisponer al hombre a enfermedades cardiovasculares por implicar hipercolesterolemia (29). Además, posiblemente este efecto está también relacionado con la reducción de los niveles plasmáticos de glucosa y la concentración de insulina (116), la cual conduce a una disminución del estímulo para la síntesis hepática de lípidos (118).

Por otra parte el AF disminuye la velocidad de la digestión del almidón por los mismos mecanismos por los que ejerce su acción antinutrientes, esto es, puede unirse o bien directamente a la α -amilasa inactivándola, o al Ca que es necesario para estabilizar la actividad amilasa, o al almidón, modificando así su grado de gelatinización o su accesibilidad para las enzimas digestivas, además influye en la respuesta sanguínea a la glucosa por producir retardo del vaciado gástrico (29).

Estudios realizados en animales y en el hombre han mostrado que la inclusión en la dieta del salvado de trigo supone un papel protector frente a diversos tipos de cáncer, especialmente de colon y mama, sin embargo en un principio no estaba claro si este efecto era debido exclusivamente a la fibra o a otros componentes como el AF (119). En este sentido, Jenab y Thompson (120) han observado que el AF presente en el salvado de trigo, así como el AF añadido a dietas con bajo contenido en fibra reduce la presencia de biomarcadores

del riesgo de cáncer. Además estudios realizados en ratas alimentadas con AF muestran una relación negativa significativa entre los niveles de AF (0,6-2,0%) y la proliferación de células epiteliales en el colon ascendente y descendente (121). El AF disminuye el riesgo de cáncer a través de varios mecanismos (29,32,122,123): (a) al unirse al Fe disminuye la formación de radicales libres durante la oxidación de los lípidos, ya que ésta es catalizada por dicho ion, (b) al unirse al Zn, que es necesario para la síntesis de ADN, reduce indirectamente la proliferación celular, (c) al retardar la digestión del almidón, éste puede llegar al colon y ser fermentado por las bacterias produciéndose ácidos grasos de cadena corta cuya actividad protectora frente al cáncer es conocida. Shamsuddin *et al.* (124, 125) han revisado el papel del AF sobre el cáncer, llegando a la conclusión de su papel no solo en la prevención sino también como agente terapéutico ya que los InsP6 incrementan la diferenciación de células malignas que a menudo resulta en una reversión al fenotipo normal (126). No obstante, el efecto del AF no es igual en todos los órganos: aunque se ha encontrado una reducción en la incidencia de nódulos hiperplásicos en el hígado, de carcinoma hepatocelular y de cáncer de mama (29,127), estudios realizados con distintos carcinógenos en esófago, intestino delgado, colon, riñones y tiroides muestran un efecto nulo del AF en la incidencia de cáncer en estos órganos (128).

En cuanto a la prevención de cálculos renales y tratamiento de la hiper calciuria, existen evidencias experimentales de que los inositol di- y trifosfato (InsP2, InsP3) son efectivos en la prevención de cristales de hidroxapatita *in vitro*, que son los que actúan como núcleo en la formación de cálculos (2, 129). Además estudios *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos, han mostrado claramente que el fitato juega un papel importante como inhibidor de la cristalización de sales cálcicas en los fluidos biológicos, siendo considerado una alternativa clara en el tratamiento de la litiasis renal (130).

Métodos de análisis

Dado que el AF no tiene un espectro de absorción característico, y por tanto no existen reactivos específicos para su identificación, su determinación ha constituido un problema analítico durante mucho tiempo. Hasta 1980, el AF era exclusivamente determinado a través de métodos de precipitación no específicos o de intercambio iónico. En la actualidad, aunque algunos de los métodos anteriores siguen vigentes, el empleo de procedimientos en los que se incluyen HPLC de fase reversa, cromatografía de par iónico o RMN es común.

Extracción del AF

En la extractabilidad del fitato presente en los distintos

alimentos y/o semillas influyen varios factores entre los que se encuentran (36,131): (a) la asociación del fitato con otros componentes, y por tanto la naturaleza de las proteínas y los cationes mono- y divalentes con los que el fitato se encuentra formando complejos, (b) el pH, (c) el tipo de solvente y fuerza iónica usada en la extracción, y (d) la presencia de Fe endógeno, que a altas concentraciones puede precipitar el fitato durante la extracción, y con ello producir un error por defecto en la cuantificación final.

Varios solventes han sido evaluados para determinar su especificidad en la extracción del AF. Los más comúnmente utilizados son el HCl (0,2 N, 0,5 N ó 0,65 N) (64,69,132-138) y el ácido tricloroacético diluido (TCA) (36,139-141). En la bibliografía también aparecen otros solventes como el H₂SO₄ al 3% (131,139) y la solución HCl 1,2% / Na₂SO₄ 10% (131,142). Reddy y Salunkhe (36) han estudiado la eficiencia de diferentes solventes en la extracción en un tipo de judía (*Phaseolus mungo*), obteniendo extracciones más completas y mayores valores de AF con TCA al 3% que con HCl al 2%. Otros autores (141,143) también han observado, en judías y trigo, una baja solubilidad del fitato en HCl debida probablemente a la formación de complejos insolubles entre fitato y proteínas. Estudios realizados por Camire y Clydesdale (139) muestran resultados similares en la extracción con H₂SO₄ al 3% y con TCA al 3%. Plaami y Kumpulainen (131) han obtenido en cereales la misma efectividad utilizando H₂SO₄ al 3% y HCl al 2,4% (0,65 M), siendo ésta menor que la de la solución HCl 1,2 % / Na₂SO₄ 10%.

En cuanto a las condiciones de extracción, algunos autores han indicado que el uso de altas temperaturas (60 °C) implica extracciones más satisfactorias, obteniéndose extractos más claros, y además se previene el desarrollo de gas durante la formación del complejo fitato férrico en los métodos de precipitación con cloruro de hierro (143). No obstante, en la mayoría de los estudios la extracción se realiza a temperatura ambiente y con agitación continua, durante tiempos que oscilan de 0,5-3 horas, tras lo cual la suspensión obtenida es centrifugada y filtrada.

Métodos de precipitación

Estos métodos están basados en el desarrollado por Heubner y Stadler (144), y la mayor parte de ellos incluyen la precipitación a bajo pH y la formación, en presencia de un exceso de ión férrico de un complejo Fe-fitato y la subsiguiente cuantificación del P, Fe o del inositol en el precipitado (71,131,141). En los casos en que la cuantificación final se realiza sobre el Fe, la concentración de P fítico es calculada usando una razón teórica Fe:P de 4:6 (139), en estos métodos es importante el lavado del precipitado obtenido ya que la presencia de SO₄⁼ o Cl⁻ en la extracción puede alterar la razón Fe:P (131). Una vez obtenido

el valor del P fítico, el cálculo del contenido de AF se realiza considerando el valor teórico 28,2% de P en la molécula de AF (22). Existen métodos indirectos en los que la cuantificación, ya sea del P (131,145) o del Fe residual (39) se realiza en el sobrenadante, y el AF es calculado por diferencia. Reddy *et al.* (54) han revisado los métodos de precipitación disponibles para la determinación del AF.

Métodos de intercambio iónico

En estos métodos la etapa de precipitación es eliminada, la extracción del fitato se realiza directamente y la solución resultante es pasada a través de una resina de intercambio iónico, eluyendo primero el P, y posteriormente el fitato que es determinado por distintos procedimientos. El uso de una columna de intercambio aniónico fue introducido por Harland y Oberleas (135) que desarrollaron un método en el que una vez extraído el fitato con HCl 1,2%, el extracto obtenido es eluido a través de una resina de intercambio iónico para separar el P inorgánico. El fitato eluido es digerido con H₂SO₄ y HNO₃ concentrado, y el contenido de P liberado cuantificado colorimétricamente. El principal inconveniente de este método es que la etapa de digestión necesita una continua atención para minimizar las pérdidas producidas como consecuencia de una digestión incompleta o excesiva (137), se ha sugerido que si la digestión ácida no es completa las muestras sean introducidas en la mufla durante 8 horas a 535°C (1). Posteriormente, Latta y Eskin (137) desarrollaron un método más rápido y simple, basándose la reacción entre el ión férrico y el ácido sulfosalicílico. En éste, el AF es primero concentrado en una resina de intercambio aniónico, y una vez eluido el P inorgánico con NaCl 0,5 M se realiza la elución del fitato con NaCl 0,7 M. La concentración de fitato se determina colorimétricamente utilizando el reactivo de Wade (FeCl₃·6H₂O al 0,03% y ácido sulfosalicílico al 3%), utilizando como estándar fitato cálcico, que es previamente convertido en AF libre y determinado con el método de Harland y Oberleas (135), o bien fitato sódico que es soluble en agua por lo que no es necesaria su conversión en AF libre.

En la actualidad sigue vigente el método considerado como oficial por la A.O.A.C. (147) desarrollado por Harland y Oberleas (17). Estos autores considerando que el fitato en la planta se encuentra unido a proteínas y minerales, modificaron su método inicial (135) mediante la inclusión del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ajuste de los extractos a pH 7, para eliminar estas uniones y mejorar así la recuperación del fitato y la exactitud del ensayo. Así, el AF es extraído de la matriz del alimento con HCl al 2,4% y el extracto obtenido, una vez filtrado, es diluido con una solución de EDTA/NaOH y lavado a través de una columna de intercambio aniónico, donde la mayoría de las impurezas son eluidas fuera de la columna, mientras que el AF es retenido en la misma.

El principal inconveniente tanto de los métodos de precipitación como de los de intercambio iónico es la falta de especificidad, como consecuencia de la dificultad del ajuste de las condiciones de hidrólisis necesarias para que sólo determinados inositol fosfato (InsP6) sean liberados para su cuantificación (147). Por ello estos métodos son válidos para aquellos cereales y leguminosas que se encuentren en estado natural, ya que en ellos básicamente sólo hay AF (InsP6), no aconsejándose su uso en alimentos procesados, ya que éstos contienen también cantidades apreciables de isómeros del AF desfosforilados como InsP5, InsP4 e InsP3 y posiblemente InsP2 e InsP (148). Estos fosfatos son determinados también en los métodos de precipitación, y en los de intercambio iónico son retenidos en la columna y eluidos con el AF por lo que deberían de ser incluidos en el cálculo de AF (149,150), ya que si no los valores de AF obtenidos serían sobrestimados.

Métodos cromatográficos

HPLC

Para solventar los inconvenientes encontrados en la determinación del AF con métodos de intercambio iónico numerosos investigadores han recurrido a la cromatografía, especialmente a la HPLC. Sin embargo debido a que los inositol fosfatos no tienen un espectro característico de absorción, su detección mediante análisis HPLC está limitada a métodos que emplean monitoreo del índice de refracción, determinación de productos de reacción postcolumna o detección indirecta, entre otros (151). En muchos de ellos la etapa inicial de obtención de los fitatos se realiza mediante intercambio iónico o precipitación. Así el método desarrollado por Graf y Dintzis (132) combina un método de intercambio iónico (135) con HPLC en una columna de C_{18} , la técnica utilizada por Camire y Clydesdale (139) se basa en la precipitación del AF como fitato férrico, seguida de su conversión en fitato sódico antes de ser inyectado en una columna de C_{18} de fase reversa, y en el método de Lehrfeld y Morris (149) la separación de los inositol fosfato se realiza según el método de Harland y Oberleas (17) y la solución resultante es concentrada y analizada por HPLC. Otros autores han mejorado el análisis con HPLC utilizando la cromatografía de intercambio iónico para separar los inositol fosfato, que son determinados con HPLC de par iónico con una columna de C_{18} fase reversa (152-154). Recientemente, Talamond *et al.* (155) han desarrollado un método HPLC con intercambio aniónico para la detección del AF en alimentos, empleando como sistema de detección la conductividad.

Entre las ventajas que presenta la HPLC en la determinación del AF hay que destacar que en estos métodos los distintos inositol fosfatos son determinados como entidades independientes, permitiendo la cuantificación de

InsP6 ó InsP5 en mezclas que incluso contienen todos los isómeros (149). La HPLC permite además la cuantificación de inositol fosfatos en presencia de nucleótidos, que en otros métodos de análisis pueden interferir en la determinación del AF (148). En los alimentos que contienen carne, pescado, extracto de levadura o cereales germinados, los nucleótidos se encuentran de forma natural, y en algunos alimentos procesados es común su adición como potenciadores del sabor. Por lo tanto en los alimentos procesados (los cuales generalmente contienen inositol parcialmente fosforilado como consecuencia de la hidrólisis del AF) la determinación del AF debería realizarse por HPLC (149).

Cromatografía iónica

Los métodos de cromatografía iónica para la determinación de AF están basados en el procedimiento de Fitchett y Woodruff (156) para medir polifosfatos en detergentes, usando el ión férrico como reactivo de derivación. Aunque en el método anterior se utilizaba inicialmente una longitud de onda de 330 nm para la detección, Phillippy y Johnston (138) observaron que el complejo fitato férrico presenta una absorbancia máxima a 290 nm. Estos autores desarrollaron un método de cromatografía iónica para determinar AF en alimentos, en el cual los extractos son directamente inyectados en la columna sin necesidad de una etapa previa de purificación. A pesar de que la reacción post-columna no es específica para los fosfatos, el fitato es eluido limpiamente en el último pico en el análisis de alimentos. El tiempo de retención del AF se determina a partir de la concentración del eluyente utilizado (normalmente HNO_3), siendo las recuperaciones obtenidas con el procedimiento de las adiciones estándar del $96 \pm 4\%$. Mas recientemente, Skoglund *et al.* (157) han mejorado la separación de los InsP6-InsP y sus isómeros de posición, utilizando columnas de intercambio aniónico de elevada fuerza. En un trabajo anterior (158), para separar los inositol fosfato del extracto crudo, estos autores compararon el uso en un método de cromatografía iónica (HPIC) de dos sistemas de detección: reacción postcolumna más detección por UV (sistema 1) y detección de la pérdida de conductividad (sistema 2); los mejores resultados se obtenían cuando InsP2-InsP6 eran determinados en el sistema 1, que también separaba iones InsP4 y InsP5, pero las fracciones que contenían InsP-InsP3 eran transferidas al segundo sistema.

Otras técnicas

La falta de especificidad de los métodos de precipitación y de intercambio iónico llevaron a O'Neill *et al.* (159) a desarrollar una técnica de Resonancia Magnética Nuclear de ^{31}P en modo Transformada de Fourier (^{31}P FT RMN) para la determinación de AF en alimentos. La RMN proporciona una elevada especificidad ya que el espectro RMN ^{31}P del

fitato es muy característico, consiste en 4 señales que conducen a una relación 1:2:2:1 de una a otra en determinados rangos de pH (138). Los métodos desarrollados por Mazzola *et al.* (138), Ersöz *et al.* (140) y Wang *et al.* (24) para determinar la concentración de fitatos en la dieta están basados en esta técnica. En estos procedimientos, una vez realizada la extracción (con HCl o TCA), a la solución resultante se le adiciona EDTA y el pH se ajusta a 4,5 antes de su análisis mediante ^{31}P FT RMN.

Plaami y Kumpulainen (131) utilizando la Espectrofotometría de Emisión Atómica-Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP-AES), han desarrollado dos métodos para la determinación de AF en cereales basándose en los métodos tradicionales. En el primero, el AF del extracto de la muestra es separado y concentrado mediante intercambio iónico y determinado como P utilizando ICP-AES. En el segundo método el AF extraído es primero precipitado con una solución de FeCl_3 , el fitato férrico producido es transformado en hidróxido férrico mediante la adición de NaOH, y el fitato sódico soluble resultante es determinado cuantitativamente por ICP-AES. En ambos métodos tanto la digestión ácida como la determinación espectrofotométrica de P son eliminadas, lo que hace que estos métodos, además de ser más exactos, sean más rápidos y simples que los métodos tradicionales.

Recientemente March *et al.* (160) han desarrollado un método fluorimétrico para la determinación del AF en alimentos y muestras de orina humana, basándose en el hecho de que el AF ejerce un efecto activador en la reacción de oxidación de la 2, 2'-dipyridyl cetona hidrazona para dar un producto que presenta una alta fluorescencia.

CONCLUSION

En las dos últimas décadas se han realizado importantes avances en el conocimiento del AF. Se han descrito nuevos papeles fisiológicos en la planta, y, en contraposición a los tradicionales efectos adversos en la dieta, se han descubierto nuevos beneficios para la salud; sin embargo, dado que la mayoría de los aspectos beneficiosos del AF son derivados de investigaciones *in vitro*, en animales o de estudios epidemiológicos, serían necesarias más investigaciones en el hombre que evaluaran conjuntamente los efectos adversos y los potenciales aspectos beneficiosos del AF de la dieta. Desde un punto de vista analítico, los métodos de análisis mediante precipitación han sido sustituidos por métodos más sensibles y exactos como HPLC, ^{31}P FT NMP y ICP-AES.

REFERENCIAS

- Wyatt CJ, Triana-Tejas A. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca and phytates in foods commonly consumed in Northern Mexico. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2204-209.
- Zhou JR, Erdman JW Jr. Phytic acid in health and disease. *C.R.C. Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35, 495-508.
- Petterson DF, Harris DJ, Rayner CJ, Blakeney AB, Choct M. Methods for the analysis of premium livestock grains. *Australian J Agric Res* 1999; 50: 775-87.
- Segueilha L, Moulin G, Galkzy P. Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castellii*. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 2451-454.
- Walsh GA, Power RF, Headon DR. Enzymes in the animal-feed industry. *Trends Food Sci Technol* 1994; 5: 81-87.
- Sugiura S H, Raboy V, Young KA, Dong FM, Hardy RW. Availability of phosphorus and trace-elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 1999; 170: 285-96.
- Bindu S, Somashekar D, Joseph R. A comparative-study on permeabilization treatments for in-situ determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. *Letters in Applied Microbiology* 1998; 27: 336-40.
- Liener IE. Implications of antinutritional components in soybean foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1994; 34: 31-67.
- Tabekhia MM, Luh BS. Effect of germination, cooking and canned on phosphorus and phytate retention in dry beans. *J Food Sci* 1980; 45: 406-08.
- Szkudelski T. Phytic acid-its influence on organism. *J Anim Feed Sci* 1997; 6: 427-438.
- Snider M, Liebman M. Calcium additives and sprouted wheat effects on phytate hydrolysis in whole wheat bread. *J Food Sci* 1992; 57 118-20.
- Harland BF, Oberleas D. Phytate in foods. *Wld Rev Nutr Diet* 1987; 52: 235-59.
- Khan N, Zaman R, Elahi M. Effect of processing on the phytic acid content of bengal grams (*Cicer arietinum*) products. *J Agric Food Chem* 1988; 36: 1274-276.
- Centeno C, Viveros A, Brenes A, Canales R, Lozano A, de la Cuadra C. Effect of several germination condition on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3208-215.
- Anderson, RJ. Contribution to the chemistry of phytin. *J Biol Chem* 1914; 17: 171.
- Cheryan M. Phytic acid interactions in food systems. *C.R.C. Crit Rev Food Sci Nutr* 1980; 13: 297-35.
- Harland BF, Oberleas D. Anion exchange method for determination of phytate in foods: a collaborative study. *J AOAC* 1986; 69: 667-70.
- Thompson LU. Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *J AOCS* 1987; 64: 1712-717.
- Wang J. Improvement of citric-acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. *Bioresource Technol* 1998; 65: 243-45.
- Lott JNA, Greenwood JS, Batten GD. Mechanisms and mineral nutrient storage during seed development. En: *Seed Development and Germination*. J. Kigel, G. Galili. (Eds). Marcel Dekker, New York 1995; p. 215.
- Frossard E, Bucher M, Mächler F, Mozafar A, Hurrell R. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe,

- Zn, and Ca in plants for human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 861-879.
22. Bhatta RS, Slinkard AE. Relationship between phytic acid and cooking quality in lentil. *Can Inst Food Sci Technol. J* 1989; 22: 137-42.
 23. Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchi-fukuoka R, Naito S. Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiol* 1999; 119: 65-72.
 24. Wang CF, Tsay SM, Lee CY, Liu SM, Aras NK. Phytate content in taiwanese diet determined by ³¹P Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1030-33.
 25. Nolan KB, Duffin PA, McWeeny DJ. Effects of phytate on mineral bioavailability. *In vitro* studies on Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd. Solubilities in presence of phytate. *J Sci Food Agric* 1987; 40: 79-85.
 26. Deshpande SS, Damodaran S. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J Food Sci* 1989; 54: 695-99.
 27. Han, YW. Removal of phytic acid from soybean and cottonseed meals. *J Agric Food Chem* 1988; 36: 1181-83.
 28. Dua S, Mahajan A, Mahajan A. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. Toria) preparations by chemical modifications. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 706-10.
 29. Thompson LU. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res Int* 1993; 26: 131-49.
 30. Bau HM, Villaume C, Nicolas JP, Méjean L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *J Sci Food Agric* 1997; 73: 1-9.
 31. Lolas M, Markakis P. Phytase of navy beans. *J Food Sci* 1977; 42: 1094-97.
 32. Graf E, Eaton JW. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Rad Biol Med* 1990; 8: 61-69.
 33. Ravindran V, Ravindran G, Sivalogan S. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem* 1994; 50: 133-36.
 34. Lathia DN, Koch M. Comparative study of phytic acid content, *in vitro* protein digestibility and amino acid composition of different types of flat breads. *J Sci Food Agric* 1989; 47: 353-64.
 35. Marero LM, Payumo EM, Aguinaldo AR, Matsumoto I, Homma S. Antinutritional factors in weaning foods prepared from germinated cereals and legumes. *Lebensm Wiss u Technol* 1991; 24: 177-81.
 36. Reddy NR, Salunkhe DK. Interactions between phytate, protein, and minerals in whey fractions of black gram. *J Food Sci* 1981; 46: 564-70.
 37. Lolas GM, Markakis P. Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Agric Food Chem* 1975; 23: 13-15.
 38. Carnovale E, Lugaro E, Lombardi-Boccia G. Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem* 1988; 65: 114-17.
 39. Griffiths DW. The phytate content and iron-binding capacity of various field bean (*Vicia faba*) preparations and extracts. *J Sci Food Agric* 1982; 33: 847-51.
 40. Beleia A, Thu Thao LT, Ida EI. Lowering phytic phosphorus by hydration of soybean. *J Food Sci* 1993; 58: 375-88.
 41. Kirby LK, Nelson TS. Total and phytate phosphorus content in some food ingredient derived from grains. *Nutr Rep Int* 1988; 37: 277-90.
 42. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 1995; 7: 1099-111.
 43. Raboy V, Gerbari P. Genetics of myo-inositol phosphate synthesis and accumulation. En: *Subcellular biochemistry: myo-inositol phosphates, phosphoinositides, and signal transduction*. Biswas, B. y Biswas, S. (Eds.). Plenum Press, New York 1996; pp.257-285.
 44. Raboy V. The biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. En: *Inositol metabolism in plants*. Morr e, D., Boss, W. y Locwus, F. (Eds.), Wiley-Liss, New York 1990; pp.55-76.
 45. Schlemmer U, M ller H, Jany KLD. The degradation of phytic acid in legumes prepared by different methods. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49: 207-10.
 46. Scott, JJ. Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. *Plant Physiol* 1991; 95: 1298-301.
 47. Gross W, y Boss WF. Inositol phospholipids and signal transduction. En: *Control of Plant Gene Expression*. D.P.S. Verma (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL 1993.
 48. Graf E, Empson KL, Eaton JW. Phytic acid: a natural antioxidant. *J Biol Chem* 1987; 262: 11647-650.
 49. Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ. Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J* 1996; 9: 537-48.
 50. Oomah BD, Kenaschuk EO, Mazza G. Phytic acid content of flaxseed as influenced by cultivar, growing-season, and location. *J Agric Food Chem* 1996; 9: 2663-666.
 51. Raboy V, Dickinson DB. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Sci* 1993; 33: 1300-305.
 52. Raboy V, y Dickinson DB. Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, magnesium, and protein among lines of *Glycine max* and *G. soja*. *Crop Sci* 1984; 24: 431-34.
 53. Urbano G, Lopez M, Fernandez M, Moreu MC, Porres J, Frias J, Vidalvalverde C. Ca and P bioavailability of processed lentils as affected by dietary fiber and phytic acid content. *Nutr Res* 1999; 19: 49-64.
 54. Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK. Methods for analysis of phytate. En: *Phytate in Cereals and Legumes*. CRC Press: Florida 1989; pp 26-36.
 55. Bau HM, Villaume C, Chandrasiri V, Nicolas JP, Méjean L. Effect de la germination sur la composition et la valeur nutritive de graines de soja chez le rat. *Sci des Aliments* 1994; 14: 688-95.
 56. Chandrasiri V, Bau HM, Villaume C, Giannangeli F, Méjean L. Effect of germinated and heated soybean meals on plasma cholesterol and triglycerides in rats. *Reproduction Nutrition Development* 1990; 30: 611-18.

57. Nair VC, Laflamme J, Duvnjak Z. Production of phytase by *Aspergillus ficcum* and reduction of phytic acid content in canola meal. *J Sci Food Agric* 1991; 54: 355-65.
58. Nayini NR, Markakis P. Phytases. En: 'Phytic Acid: Chemistry and Applications. E. Graf. (Ed). Pilatus Press: Minneapolis 1986; pp. 23-42.
59. Schroder B, Breves G, Rodehutschord M. Mechanisms of intestinal phosphorus absorption and availability of dietary phosphorus in pigs. *DTW Dtsch Tierarztl Wochensc* 1996; 103: 209-14.
60. Ferguson EL, Gibson RS, Thompson LU, Ounpuu S, Berry M. Phytase, zinc, and colon content of 30 East African foods and their calculated phytate: Zn, Ca: phytate and [Ca]/[phytate]/[Zn] molar ratios. *J Food Comp Anal* 1988; 1: 316-25.
61. Reddy NR, Pierson MD, Salunkhe DK. Legumes-Based Fermented Foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1982; 17: 335-370.
62. Khokhar S, Pushpanjali, Fenwick GR. Phytate content of indian foods and intakes by vegetarian indians of Hisar region, Haryana State. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2440-444.
63. Rasco BA, Gazzaz SS, Dong DD. Iron, calcium, zinc, and phytic acid content of yeast-raised breads containing distillers grains and other fiber ingredients. *J Food Comp Anal* 1990; 3: 88-95.
64. Gupta M, Khetarpaul N. Effect of rabadi fermentation of phytic acid and *in vitro* digestibility of barley. *Die Nahrung* 1993; 37: 141-46.
65. Lee D, Schoroeder J, Gordon DT. Enhancement of copper bioavailability in the rat by phytic acid. *J Nutr* 1988; 118: 712-17.
66. Atwal A, Eskin N, McDonald B, Vaisey-Genser M. The effects of phytase on nitrogen utilization and zinc metabolism in young rats. *Nutr. Rep Int* 1980; 21: 257-67.
67. Chitra U, Vimala V, Singh U, Geervani P. Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods Human Nutr* 1995; 47: 163-72.
68. Knuckles BE, Kuzmicky DD, Gumbman MR, Betschart AA. Effect of myoinositol phosphate esters and *in vivo* digestibility of proteins. *J Food Sci* 1989; 54: 1348-50.
69. Kumar A, Chauhan BM. Effects of phytic acid on protein digestibility (*in vitro*) and HCl-extractibility of minerals in pearl millet sprouts. *Cereal Chem* 1993; 70: 504-05.
70. Barampama Z, Simard R E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chem* 1993; 47: 159-67.
71. Reddy NR., Balakrishnan CV, Salunkhe DK. Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of blackgram (*Phaseolus mungo* L.) seeds. *J Food Sci* 1978; 43: 540-42.
72. Sharma A, Khetarpaul N. Fermentation of rice-bengal gram dhal blends with whey: changes in phytic acid content and *in vitro* digestibility of starch and protein. *Nahrung* 1995; 39: 282-87.
73. Thompson LU, Serraino M. Effect of phytic acid reduction on rapeseed protein digestibility and aminoacid absorption. *J Agric Food Chem* 1986; 34: 468-69.
74. Anderson P A. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. En: *Digestibility and Aminoacids Availability in Cereals and Oilseeds*. J.W. Finley and D.T. Hopkins (Eds.). Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul. 1985 p. 31
75. Serraino MR, Thompson LU, Savoie L, Parent G. Effect of phytic acid on the *in vitro* rate of digestibility of rapeseed protein and amino acids. *J Food Sci* 1985; 50: 1689-692.
76. Siddhuraju P, Vijayakumari K, Janardhanan K. Chemical composition and nutritional evaluation of an under exploited legume, *Acacia nilotica* (L) Del. *Food Chem* 1996; 3: 385-91.
77. Thompson LU. Antinutrients and blood glucose. *Food Technol* 1988; 42: 123-32.
78. Deshpande SS, Cheryan M. Effects of phytic acid, divalent cations and their interactions on α -amilase activity. *J Food Sci* 1984; 49: 516-19.
79. Churella HR, Vivian VM. Effect of phytic acid level in soy protein based formulas on mineral availability in rat. *J Agric Food Chem* 1989; 37: 1352-357.
80. Rimbach G, Pallauf J. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 37-45.
81. Graf E, Eaton JW. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer* 1993; 19: 11-19.
82. Jovani M, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ, Clemente G. Effects of protein, phytates, ascorbic acid and citric acid on dialysability of calcium, iron, zinc and copper in soy-based infant formulas. *Nahrung* 2000; 44: 114-117.
83. Skoglund E, Carlsson NG, Sandberg AS. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 431-36.
84. Skoglund E, Larsen T, Sandberg AS. Comparison between steeping and pelleting a mixed diet at different calcium levels on phytate degradation in pigs. *Can J Animal Sci* 1997; 77: 471-77.
85. Fordyce EJ, Forbes RM, Robbins KR, Erdman JW Jr. Phytate x calcium/zinc molar ratios: are they predictive of zinc bioavailability? *J Food Sci* 1987; 52: 440-44.
86. Plaami S. Myoinositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition. *Lebensm Wiss u Technol* 1997; 30: 633-647.
87. Morris ER. Phytate and dietary mineral availability. En: *Phytic Acid: Chemistry and Applications*. E. Graf. (Ed). Pilatus Press: Minneapolis 1986; pp. 57-76.
88. Knox T, Kassarjian Z, Dawson-Hughes B. Calcium absorption in elderly subjects on high and low fiber diets: effects of gastric acidity. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 1480-486.
89. Heany RP, Weaver CM, Fitzsimmons ML. Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 745-47.
90. Lonnerdal B, Sandberg AS, Sandstorm B, Kunz C. Inhibitory effects of phytic acid and others inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J Nutr* 1989; 119: 211-14.
91. Miyazawa E, Yoshida T. Effects of dietary levels of phytate and inorganic phosphates on phytate breakdown and absorption of calcium and magnesium in rats. *Nutr Res* 1991; 11: 797-806.

92. Ranhotra GS, Gelroth JA, Torrence FA, Bock MA, Winterringer GL. Bread (white and whole wheat) and not fat dry milk as sources of bioavailable calcium for rats. *J Nutr* 1981; 111: 2081-86.
93. Mason AC, Weaver CM, Kimmel S, Brown RK. Effects of soybean phytate content on calcium bioavailability in mature and immature rats. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 246-49.
94. Poneros AG, Erdman JW. Bioavailability of calcium from sesame seeds, almond powder, whole wheat bread, spinach and non-fat dry milk in rats. *J Food Sci* 1989; 54: 150-53.
95. Gifford-Steffen S R, Clydesdale FM. Effect of varying concentrations of phytate, calcium, and zinc on the solubility of protein, calcium, zinc, and phytate in soy protein concentrate. *J Food Protect* 1993; 56: 42-46.
96. Pallauf J, Rimbach G. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch Tierernahr* 1997; 50: 301-19.
97. Brune M, Rossander L, Gleerup A, Sandberg A S. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J Nutr* 1992; 122: 442-29.
98. Cook JD, Reddy MB, Burri J, Juillerat M, Hurrell RF. The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 964-9.
99. Tuntawiroon M, Sritongkul N, Rossander HL, Pleehachinda R, Suwanik R, Brune R, Hallberg L. Rice and iron absorption in man. *Eur J Clin Nutr* 1990; 44: 489-97.
100. Simpson KM, Morris ER, Cook JD. The inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am. J Clinical Nutr* 1981; 34: 1469-478.
101. Davidsson L, Galán P, Kastenmayer P, Cherouvrier F, Juillera M, Hercberg S, Hurrell RF. Iron bioavailability studied in infants: the influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatric Res* 1994; 6: 816-22.
102. Siegenberg D, Baynes RD, Bothwell TH, Mcfarlane BJ, Lamparelli RD, Car NG, Macphail P, Schmidt U, Tal A, Mayet F. Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am. J Clinical Nutr* 1991; 53: 537-41.
103. Zhou J, Fordyce EJ, Raboy DB, Dickinson M, Wong M, Burns RA, Erdman Jr. Reduction of phytic acid in soys products improves zinc bioavailability in rats. *J Nutr* 1992; 122: 2466-473.
104. Lonnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr* 2000; 130: 1378S-83S.
105. Anónimo. Dieta alimentaria española. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, M.A.P.A., Secretaria General Técnica, Madrid 1991; cap. 6: pp. 257-59.
106. Fitzgerald S L, Gibson RS, Quan de Serrano J, Portocarrero L, Vasquez A, de Zepeda E, Lopez-Palacios C Y, Thompson LU, Stephen AM, Solomons NW. Trace element intakes and dietary phytate/Zn and Ca x phytate/Zn millimolar ratios of periurban guatemalan women during the third trimester of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 195-201.
107. Lo GS, Settle SL, Steinke FH, Hopkins DT. Effect phytate:zinc molar ratio and isolated soybean protein on zinc bioavailability. *J Nutr* 1981; 111: 2223-235.
108. Morris ER, Ellis R. Effect of dietary phytate/zinc molar ratio on growth and bone zinc response of rat fed semipurified diets. *J Nutr* 1980; 110: 1037-47.
109. Wise A. Influence of calcium on trace metal-phytate interactions. En: *Phytic Acid: Chemistry and Applications*. E. Graf. (Ed). Pilatus Press: Minneapolis 1986; p. 151.
110. Davies NT, Carswell AJP, Mills CF. The effects on variation in dietary calcium intake on the phytate-zinc interactions in rats. En: *Trace Elements in Man and Animals*. C. F. Mills, I. Bremner and J. K. Chesters (Eds). Aberdeen, Scotland 1985; p. 456.
111. Platt SR, Clydesdale FM. Binding of iron by cellulose, lignin, sodium phytate and β -glucan, alone and in combination, under simulated gastrointestinal pH conditions. *J Food Sci* 1984; 49: 531-35.
112. Torre M, Rodriguez AR, Saura-Calixto F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1991; 1: 1-22.
113. Mendoza C, Viteri FE, Lonnerdal B, Young KA, Raboy V, Brown KH. Effect of genetically-modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1123-127.
114. Vucenik I, Kalebic T, Tantivejkul K, Shamsuddin AM. Novel anticancer function of inositol hexaphosphate - inhibition of human rhabdomyosarcoma *in-vitro* and *in-vivo*. *Anticancer Res* 1998; 18: 1377-84.
115. Jariwalla RJ, Sabin R, Lawson S, Herman ZS. Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cation by dietary phytase. *J Appl Nutr* 1990; 42: 18-28.
116. Slavin J, Jacobs D, Marquart L. Whole grain consumption and chronic disease protective mechanisms. *J Nutr Cáncer* 1997; 1: 14-21.
117. Jariwalla RJ. Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Res*. 1999; 19: 3699-702.
118. Wolever TMS. The glycemic index. *Wld Rev Nutr Diet* 1990; 62: 120-25.
119. Ferguson LR, Harris PJ. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur J Cáncer Prev* 1999; 8:17-25.
120. Jenab M, Thompson LU. The influence of phytic acid in wheat bran on early biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogen* 1998; 19: 1087-92.
121. Nielsen BK, Thompson LU, Bird RP. Effect of phytic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Cáncer Lett* 1987; 37: 317-25.
122. Newmark HL, Lupton JR. Determinants and consequences of colonic pH: implications for colon cancer. *Nutr Cáncer* 1990; 14: 161-73.
123. Phillippy BQ, Graf E. Antioxidant functions of inositol 1,2,3-trisphosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate. *Free Rad Biol Med* 1997; 6: 939-46.
124. Shamsuddin AM. Metabolism and cellular functions of IP6: a review. *Anticancer Res* 1999; 19: 3733-6.
125. Shamsuddin AM, Vucenik I. Mammary tumor inhibition by IP6: a review. *Anticancer Res* 1999; 19: 3671-4.
126. Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE IP6: a novel anti-cancer agent. *Life Sci* 1997; 61: 343-54.
127. Shamsuddin AM, Yang GY, Vucenik IN. Anticancer functions of Ips-growth-inhibition and differentiation of human

- mammary-cancer cell-lines *in vitro*. *Anticancer Res* 1996; 6A: 3287-292.
128. Horose M, Ozaki K, Takaba K, Fukushima S, Shirai T, Ito N. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-triacontan-16, 18-dione in rat wide spectrum organ carcinogenesis model. *Carcinogen* 1991; 12: 1917-921.
 129. Modlin M. Urinary phosphorylated inositols and renal stones. *Lancet* 1980; 2: 1113-114.
 130. Grases F, y Costa-Bauza A. Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res* 1999; 19: 3717-22.
 131. Thompson DB, Erdman J JrW. Phytic acid determination in soybeans. *J Food Sci* 1982; 47: 513-17.
 132. Graf E, Dintzis RF. Determination of phytic acid in foods by High-Performance Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem* 1982; 30: 1094-97.
 133. Gustafsson EL, Sandberg AS. Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci* 1995; 60: 149-56.
 134. Harland BF, Oberleas D. A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chem* 1977; 54: 827-32.
 135. Kaur D, Kapoor AC. Some antinutritional factors in rice bean (*Vigna umbellata*): effects of domestic processing and cooking methods. *Food Chem* 1990; 37: 171-79.
 136. Latta M, Eskin M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem* 1980; 28: 1313-315.
 137. Mazzola EP, Phyllippy BQ, Harland BF, Miller TH, Potemra JM, Katsimpiris EW. Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic determination of phytate in foods. *J Agric Food Chem* 1986; 34: 60-62.
 138. Phyllippy BQ, Johnston MR. Determination of phytic acid in foods by ion chromatography with post-column derivatization. *J Food Sci* 1985; 50: 541-42.
 139. Camire AL, Clydesdale FM. Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *J Food Sci* 1982; 47: 575-78.
 140. Ersöz A, Akgün H, Aras NK. Determination of phytate in turkish diet by Phosphorus-31 Fourier transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 733-35.
 141. Wheeler E, Ferrel RE. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem* 1971; 48: 312-20.
 142. Zemel MB, Shelef LA. Phytic acid hidrolisis and soluble zinc and iron in whole wheat bread as affected by calcium containing additives. *J Food Sci* 1982; 47: 535-37.
 143. Chang R, Schwimmer S, Burr, HK. Phytate: removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J Food Sci* 1977; 42: 1098-101.
 144. Heubner W, Stadler H. Uber eine tritationsmetthode zur bestimmung des phytins. *Biochem Zeitschrift* 1914; 64: 422-37.
 145. Tangkongchitr U, Seib PA, Hosenev R.C. Phytic acid I. Determination of 3 forms of phosphorus in flour, dough and bread. *Cereal Chem* 1981; 58: 229-34.
 146. AOAC. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International. Vols. 1 and 2. W. Horwitz (Ed.). AOAC International, Washington, D.C 1990.
 147. Plaami S, Kumpulainen J. Determination of phytic acid in cereals using ICP-AES to determine phosphorus. *J AOAC* 1991; 74: 32-36.
 148. Phillippy BQ, Johnston MR, Tao SH, Fox MRS. Inositol phosphates in processeed foods. *J Food Sci* 1988; 53: 496-99.
 149. Lehrfeld J, Morris ER. Overestimation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2208-210.
 150. Wise A, Lockie GM, Liddell J. Dietary intakes of phytate and its meal distribution pattern amongs staff and students in a institution of higher education. *British J Nutr* 1987; 58: 337-46.
 151. Xu P, Price J, Aggett PJ. Recent advances in methodology for analysis of phytate and inositol phosphates in foods. *Progr Food Nutr Sci* 1992; 16: 245-62.
 152. Lee K, Abendroch JA. High performance liquid chromatographic determination of phytic acid in foods. *J Food Sci* 1983; 48: 1344-351.
 153. Burbano C, Muzquiz, M, Osagie A, Ayet G, Cuadrado C. Determination of phytate and lower inositol phosphates in spanish legumes by HPLC methodology. *J Food Chem* 1995; 52: 321-25.
 154. Larsson M, Sandberg AS. Malting of oats in a pilot-plant process. Effects of heat treatment, storage and soaking conditions on phytate reduction. *J Cereal Sci* 1995; 21: 87-95.
 155. Talamond P, Doubeau S, Rochette I, Guyot JP Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *J Chromatogr A* 2000; 871:7-12.
 156. Fitchett AW, Woodruff A. Determinations of polyvalent anions by ion chromatography. *Liq Chromatogr HPLC Mag* 1983; 1: 48.
 157. Skoglund E, Carlsson NG, Sandberg AS. High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 1877-82.
 158. Skoglund E, Nasi M, Sandberg AS. Phytate hydrolysis in pigs fed a barley-rapeseed meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or steeped with whey. *Can J Animal Sci* 1998; 78: 175-80.
 159. O'Neill IK, Sargent M, Trimble ML. Determination of phytate in foods by phosphorus-31-transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal Chem* 1980; 52: 1288-291.
 160. March JG, Simonet BM, Grases F. Fluorimetric determination of phytic acid based on the activation of the oxidation of 2,2'-dipyridyl ketone hydrazone catalysed by Cu (II). *Analyst* 1999; 124: 897-900.

Recibido: 15-02-2001

Acceptado:10-06-2002

Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional

Germán Chamorro, María Salazar, Katia Gomes de Lima Araújo, César Pereira dos Santos, Guillermo Ceballos y Luis Fabila Castillo

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, M.A.D. México
Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Brasil

RESUMEN. La *Spirulina* (*Arthrospira*), alga filamentosa unicelular, es una cianobacteria que se cultiva en algunos países, como alimento para consumo humano y animal, así como para la obtención de aditivos utilizados en formas farmacéuticas y alimentos. Esta alga es fuente rica en proteínas, vitaminas, aminoácidos, minerales y otros nutrientes, por lo que su principal uso es como suplemento alimenticio. Sin embargo, en los últimos años se le han atribuido diversas propiedades farmacológicas. Así, se ha comprobado a nivel experimental in vivo e in vitro su efectividad en el tratamiento de algunos tipos de alergias, anemia, cáncer, hepatotoxicidad, enfermedades virales y cardiovasculares, hiperglicemia, hiperlipemia, inmunodeficiencia y procesos inflamatorios, entre otros. Varias de esas actividades se deben a la *Spirulina* per se o a algunos de sus constituyentes, entre los que destacan el ácido graso poliinsaturado ω -3 y ω -6, β -caroteno, α -tocoferol, ficocianina, compuestos fenólicos y un complejo aislado recientemente, el Ca-Spirulan (Ca-SP). En el presente artículo se hace una actualización y revisión crítica de los resultados publicados durante los últimos años, en relación a tales propiedades. Se concluye que aunque esta cianobacteria ha sido de las más estudiadas desde el punto de vista químico, farmacológico y toxicológico, es necesario ampliar las investigaciones con el fin de contar con datos más consistentes para su posible aplicación en seres humanos.

Palabras clave: Algas verde azules, *Spirulina*, *Arthrospira*, farmacología.

SUMMARY. Update on the pharmacology of *Spirulina* (*Arthrospira*), an unconventional food. *Spirulina* (*Arthrospira*), a filamentous, unicellular alga, is a cyanobacterium grown in certain countries as food for human and animal consumption. It is also used to derive additives in pharmaceuticals and foods. This alga is a rich source of proteins, vitamins, amino acids, minerals, and other nutrients. Its main use, therefore, is as a food supplement. Over the last few years, however, it has been found to have many additional pharmacological properties. Thus, it has been experimentally proven, in vivo and in vitro that it is effective to treat certain allergies, anemia, cancer, hepatotoxicity, viral and cardiovascular diseases, hyperglycemia, hyperlipidemia, immunodeficiency, and inflammatory processes, among others. Several of these activities are attributed to *Spirulina* itself or to some of its components including fatty acids ω -3 or ω -6, β -carotene, α -tocopherol, phycocyanin, phenol compounds, and a recently isolated complex, Ca-Spirulan (Ca-SP). This paper aims to update and critically review the results published over the last few years with regards to these properties. The conclusion is that even if this cyanobacterium has been one of the most extensively studied from the chemical, pharmacological and toxicological points of view, it is still necessary to expand the research in order to have more consistent data for its possible use in human beings.

Key words: Blue-green algae, *Spirulina*, *Arthrospira*, pharmacology.

INTRODUCCION

El uso de las algas en el tratamiento o prevención de diversos padecimientos es conocido desde hace algunos años, comprobándose sus propiedades farmacológicas en diferentes modelos experimentales (1). Entre ellas destacan las de la cianobacteria *Spirulina*, alga verde-azul que en algunos países se cultiva como suplemento alimenticio, fuente de colorantes y de aditivos para las industrias farmacéutica y alimentaria (2).

Estudios a corto, mediano y largo plazo en animales de laboratorio (3-8) han demostrado que la *Spirulina* no produce efectos indeseables, lo que representa una ventaja en relación a otras algas, que han ocasionado toxicidad y muerte en animales domésticos y salvajes (9), así como en el humano (10),

principalmente por la presencia de hepato y neurotoxinas (11).

Belay et al. (12) y Chamorro et al. (13), publicaron una revisión sobre trabajos que se habían realizado hasta entonces en la literatura científica sobre farmacología y toxicología de la *Spirulina*. Después, diferentes autores han continuado con el estudio de algunos de esos efectos o descubriendo nuevas propiedades del alga, que han dado lugar a un número importante de publicaciones. De la misma forma, se han efectuado estudios con sus componentes como ácido γ -linolénico, ficocianina y el Ca-SP, un polisacárido sulfatado. Este último, quelante de ese metal (14-16).

El objetivo del presente artículo es hacer una actualización y análisis crítico de tales trabajos, con el fin de conocer otras posibles aplicaciones farmacéuticas de la

Spirulina y componentes mencionados. Además, con el propósito de contar con un panorama general de las diferentes propiedades del alga, en la Tabla I se hace un resumen de los diversos trabajos analizados, indicando la actividad terapéutica, modelo utilizado, resultados obtenidos y referencia consultada.

TABLA 1
Recientes estudios sobre efectos farmacológicos de alga *Spirulina*

Efecto	Modelo	Resumen de resultados	Referencia
1. Antialérgico	Rata	La inoculación intraperitoneal inhibió varios tipos de reacciones alérgicas.	18
		<i>In vitro</i> previno la producción de tNF-alfa por macrófagos peritoneales. Resultados similares se obtuvieron con la proveniente de otra fuente.	19
2. Antianémico	Rata	Sola o en combinación con gluten de trigo, aumentó el contenido de hierro y hemoglobina durante la primera semana de la gestación y en la lactación.	20
3. Anticancerígeno	Células	Siete administraciones intravenosas de 100 µg de Ca-SP cada una, obtenido del alga, causaron marcada disminución de tumor pulmonar colonizado con células B16-B6.	24
	Ratón	Redujo el citocromo P450 hepático, inducción de la glutation-S-transferasa hepática; sin embargo, la actividad de la glutation-S-transferasa extrahepática. no presentó cambios.	25
4. Anticoagulante	Cofactor heparina	Aumentó el tiempo de sobrevida de ratones BALB/c inoculados con el linfosarcoma L517BY Un polisacárido aislado del alga aumentó en más de mil veces la actividad antitrombina del cofactor II de la heparina.	26
	Fibroblastos	El mismo polisacárido incrementó la producción de activador del plasminógeno, en una línea celular de fibroblastos humanos.	32
5. Antigenotóxico	Células	Extractos acuosos y orgánicos inhibieron la frecuencia de micronúcleos en células meióticas de <i>Tradescantia</i> , inducida por la hidrazida maleico.	33
6. Antihepatotóxico	Rata	La <i>Spirulina</i> , el extracto oleoso y la fracción del alga exenta de grasa previnieron el hígado graso inducido por tetracloruro de carbono.	34
		La ficocianina, proveniente del alga, protegió contra la hepatotoxicidad producida por tetracloruro de carbono y pulegona.	37.41
7. Antiinflamatorio	Ratón	La ficocianina, obtenida de <i>Spirulina</i> , redujo la inflamación producida por peróxido.	42
	Ratón y rata	La ficocianina, obtenida de la cianobacteria, mostró actividad antiinflamatoria en cinco modelos experimentales.	45
	Ratón	Extractos de ficocianina obtenidos de <i>Spirulina</i> inhibieron el edema en oído y las concentraciones de LTB ₄ inducidos por ácido araquidónico.	46
	Rata	La ficocianina, obtenida de <i>Spirulina</i> , redujo la actividad de la mieloperoxidasa e inhibió la infiltración celular inflamatoria y el daño en colon.	47
8. Antiparasitario	Ratón	En ratones inoculados con <i>Plasmodium chabaudi</i> no se observó efectos en la parasitemia pero tampoco desarrollaron recrudescencia.	49
9. Antitóxico	Rata	Redujo la toxicidad del plomo sobre testículos, peso corporal y diámetro tubular.	26
10. Antiviral	Células humanas	Un extracto acuoso inhibió en 50% la producción de HIV-1 en líneas de células humanas, células mononucleares y células de Laangerhans.	50
	Virus	El Ca-Spirulan inhibió la replicación de HIV-1 y HSV-1 en líneas de células humanas. El reemplazo del ion Ca por iones de Na y K en la molécula de Ca-SP, conservó su actividad antiviral.	55
11. Cardiovascular	Anillos aórticos	Administrada durante dos semanas, al 5% en la dieta, mostró efectos sobre las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio en anillos de aorta.	14, 15
		Administrada durante seis semanas, al 5% en la dieta, previno los efectos vasomotores de una dieta rica en fructosa (60%) en anillos de aorta de rata.	54
		El extracto alcohólico aumentó la síntesis de NO por el endotelio y de un prostanoides vasoconstrictor por células no endoteliales.	61
12. Hipoglucemiante	Rata	El extracto metanólico causó disminución del área bajo la curva de glucosa en animales diabéticos, sugiriendo efecto hipoglucemiante. Sin embargo, el extracto diclorometanólico produjo efecto hiperglicemiante en normales y diabéticos, mostrando la existencia de principios antagonísticos en el alga.	62
13. Hipolipidémico	Rata	Disminución del colesterol hepático incrementado por el tetracloruro de carbono.	63
14. Inmunoestimulante	Ratón	La incorporación a la dieta de ratones normales mejoró la respuesta de anticuerpos a eritrocitos de carnero	64
		La administración simultánea oral con un antígeno, incrementó la respuesta de IgA en intestino.	41
	Pollo	La administración de un extracto a cultivos de macrófagos peritoneales de pollo aumentó su capacidad fagocítica.	72
	Gatos	La incorporación a la dieta de pollos, mejoró su respuesta secundaria de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero, la respuesta mitogénica a PHA, la actividad fagocítica de macrófagos y la actividad NK.	17
		La adición de extracto a cultivos de macrófagos de gato aumentó su capacidad fagocítica.	69
			70
			71

Antialérgico

Se ha sugerido que la *Spirulina* protege contra el desarrollo de alergias (17) habiéndose publicado al respecto dos trabajos, donde se demuestra que el alga disminuye las reacciones anafilácticas (18,19). El experimento consistió en administrar a ratas un compuesto que desgranula las células cebadas, produciendo un choque anafiláctico mortal. La inyección de suspensión de *Spirulina* por vía intraperitoneal una hora antes de la administración del compuesto, evitó la muerte de los animales en un 100% e inhibió una reacción de anafilaxia cutánea pasiva. En estos mismos trabajos se demostró que en cultivos de células cebadas intraperitoneales, la *Spirulina* bloquea la liberación de histamina y del factor de necrosis tumoral (TNF- α) inducida por IgE.

La reducción de las manifestaciones de la anafilaxia tanto *in vivo* como *in vitro*, se debe posiblemente a un efecto directo sobre las células cebadas (18, 19). Es importante que estos hallazgos se confirmen empleando otros modelos experimentales.

Antianémico

La *Spirulina* incluida en la dieta de ratas a concentración del 45% (equivalente al 22% de proteína) y proporcionada sola o en combinación con gluten de trigo durante la primer mitad de la gestación y la lactación, aumentó el contenido de hierro y hemoglobina más que la de la caseína y gluten de trigo juntos, habiendo también incrementado el número de fetos por madre (20). Así mismo se observó que la pérdida tanto del hierro almacenado como del sérico en el día 20 de la gestación fue relativamente mayor que en los grupos alimentados con *Spirulina*. Esto puede deberse a un aumento en la demanda de hierro, debido a que las ratas alimentadas con el alga, tuvieron mayor número de productos que los testigos. El estudio muestra un buen potencial hematológico de la *Spirulina* durante la gestación y lactación, por lo que puede servir como un suplemento para combatir la anemia, siendo la disponibilidad del metal en la *Spirulina* comparable a la del sulfato de hierro estándar (21).

El suplemento de hierro durante ciertos períodos de la gestación es muy importante (22). En el caso del humano, el hierro materno pasa a través de la placenta por transporte activo y una deficiencia da como resultado una carencia en el almacenamiento de este nutriente por parte del neonato (23).

Anticancerígeno

En un experimento realizado recientemente por Mishima et al., (24), se observó que el Ca-SP inhibió la invasión de melanoma B16-B6, carcinoma de colon 26M3.1 y células del fibrosarcoma HT-1080, a través de la reconstitución de la membrana basal (matrigel). También detuvo la migración haptotáctica de células tumorales a la laminina, aunque no

tuvo efecto sobre la fibronectina.

Mittal et al. (25) por su parte, observaron después de la administración oral de 800 mg/kg de *Spirulina* a ratones, inducción significativa en la actividad de la glutatión-S-transferasa hepática, enzima involucrada en el desarrollo de tumores.

Así mismo, Ramírez Villa (26) encontró que al inocular ratones BALB/c con el linfosarcoma L5178Y y administrarles *Spirulina* a dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg por vía oral, hubo tendencia a una mayor supervivencia, hecho que fue significativo a la dosis superior.

La protección contra el cáncer ha sido atribuida a los componentes del alga con actividad antioxidante, entre los cuales se encuentra el β -caroteno (27), uno de los principales carotenoides implicados en el sistema de defensa contra los radicales libres. El β -caroteno natural, que se encuentra en cantidad importante en *Spirulina*, *Dunaliella*, en muchas frutas y vegetales, contiene aproximadamente 50% de todo-trans β -caroteno así como también 9-cis- β -caroteno (28).

Además de los carotenoides, la ficocianina, una de las principales ficobiliproteínas de la *Spirulina*, que bajo ciertas condiciones de crecimiento puede representar más del 20% de la proteína, ha revelado propiedades preventivas. Así, al inducir tumores en ratones, la supervivencia de los alimentados con ficocianina fue significativamente más alta que la de los grupos testigo (29). En estudios posteriores con estos roedores, se observó que la ficocianina aumentó la actividad linfocítica, lo que sugiere que puede estimular el sistema inmune, protegiendo contra una variedad de enfermedades.

Los resultados del estudio de Mishima et al. (24) muestran por su parte que el complejo Ca-SP, puede reducir la metástasis pulmonar de células B16-B6 de melanoma por inhibición de la invasión tumoral de la membrana basal, probablemente a través de la prevención de la adhesión y migración de las células tumorales a la laminina y de la actividad heparanasa.

Los hallazgos mencionados eran de esperarse pues previamente se encontró que, extractos combinados de dos algas, *Spirulina* y *Dunaliella*, ricas en β -caroteno, inhibieron la carcinogénesis provocada en la cavidad oral de crickets, posiblemente por estimulación de la respuesta inmune (30, 31).

Sin embargo, se puede decir que es prematuro atribuir con certeza a la *Spirulina* o ficocianina una quimiopreención del cáncer. Deben esperarse los resultados de estudios clínicos, actualmente en marcha, antes de su aplicación en grandes poblaciones (28).

Anticoagulante

El Ca-SP aumentó en 10,000 veces la actividad anti-trombina del cofactor II de la heparina (32) e indujo

eficientemente la producción de un activador de plasminógeno específico de tejido a través de un proceso translacional, cuyo mecanismo se desconoce.

Debido a que el CA-SP es un polisacárido sulfatado nuevo, diferente de la heparina, es de esperarse que puedan conocerse en el futuro otras actividades biológicas (33). Aunque estos dos efectos fueron estudiados en experimentos *in vitro* indican que la *Spirulina* también podría tener una actividad anticoagulante importante *in vivo*.

Antigenotóxico

Recientemente, Paz-González (34) demostró que los extractos acuoso y orgánico del alga, inhibieron la frecuencia de micronúcleos inducida por la hidrazida maleico, en células meióticas de *Tradescantia*. En el caso del extracto acuoso, los resultados indicaron una capacidad inhibitoria hasta del 79.4% y con el extracto de dimetilsulfóxido, hasta del 59.4%. Al mismo tiempo se encontró que de los pigmentos obtenidos de *Spirulina*, el β -caroteno inhibió 46.2%, la clorofilina 37.6% y la ficocianina, el 45.3%.

Es muy probable que este efecto se deba a los diferentes mecanismos de quimioprotección, entre los cuales es posible la inducción de la capacidad celular para reparar el daño inducido en el DNA y el aumento en la actividad antioxidante a través del atrapamiento de radicales libres u otros mecanismos celulares y extracelulares (35). Ya en estudios anteriores efectuados por Qishen et al., (36), en los que la *Spirulina* redujo la frecuencia de micronúcleos en médula ósea de ratones sometidos a radiaciones gama, se anticipó que su efecto protector se debía probablemente a un mecanismo similar.

La actividad antioxidante del alga se ha demostrado utilizando homogeneizado de hígado de rata (37) o plasma (38). Al parecer, la ficocianina es uno de los componentes responsable de esta acción, como fue demostrado por Romay y González (39) y específicamente su grupo cromóforo, la ficocianobilina, de acuerdo a lo que fue comunicado por Bhat y Madyastha (40) en experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Antihepatotóxico

Torres-Durán et al. (41) comunicaron que la *Spirulina*, proporcionada a ratas a una concentración del 5% en la dieta, disminuyó la concentración de triacilgliceroles séricos, que había sido incrementada por tetracloruro de carbono, 2 o 4 días después de su administración. Vadiraja et al. (42), además, encontraron que la ficocianina C, proveniente de *Spirulina*, administrada también a ratas por vía intraperitoneal a dosis de 200 mg/kg antes de R-(+) pulegón o tetracloruro de carbono, daba lugar a concentraciones de la transaminasa glutámico oxalacética igual que en los testigos y evitaba el decremento de citocromo P450 microsomal, glucosa-6-fosfatasa y aminopirina-N-desmetilasa, indicando una

protección de las enzimas hepáticas.

Ya que el efecto hepatotóxico, está relacionado con la producción de radicales libres, es posible que el potencial hepatoprotector de *Spirulina maxima*, se deba a sus constituyentes tales como ácido γ -linolénico, sulfolípidos, selenio, clorofila, caroteno y vitaminas E y C (43). El ácido γ -linolénico y los sulfolípidos han sido también implicados en otras propiedades farmacológicas (44).

La ficocianina, que igualmente inhibió el daño hepático producido por R-(+) pulegón y CCl₄, lo hace posiblemente reduciendo la formación de metabolitos reactivos (42).

Antiinflamatorio

Dosis de 100 y 200 mg/kg de ficocianina C, obtenida de *Spirulina*, administradas oralmente a ratones, redujeron la inflamación de las extremidades producida por glucosa oxidasa (45). En otro experimento Romay et al. (46), encontraron que este pigmento disminuyó significativamente el edema producido por ácido araquidónico y acetato de 12-O-tetradecanoil forbol. También redujo el causado por la inoculación de carragenina en la extremidad posterior de ratas y el granuloma provocado por la implantación de algodón. En un reciente experimento, Romay et al., (47) encontraron que la ficocianina C inhibió significativamente el edema y las concentraciones de leucotrieno TB₄ inducidos por ácido araquidónico. Además se encontró efecto antiinflamatorio en la colitis, originado en ratas por enema de 1 ml de ácido acético al 4%.

Es probable que la actividad antiinflamatoria se deba también a sus propiedades antioxidantes, al atrapamiento de radicales libres de oxígeno y tal vez a su efecto inhibitorio en el metabolismo del ácido araquidónico (46). En relación a lo anterior, hay bastante evidencia de que ciertos tipos de inflamación tisular son causados por especies reactivas de oxígeno (48). En efecto, en los sitios de inflamación se forman oxidantes tales como radicales superóxido e hidroxilo, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso.

Es posible que la reducción del edema y concentraciones de leucotrieno TB₄ en los oídos de ratones se deba a un efecto inhibitorio directo de la ficocianina sobre la 5-lipoxigenasa, además de sus propiedades antioxidantes (47).

Tomando en cuenta que las microalgas son usadas como suplementos dietéticos en muchos países, los resultados con ficocianina en el tratamiento de la colitis son evidentes y pueden ser relevantes para el uso potencial de las microalgas como suplemento en pacientes con padecimientos inflamatorios del intestino (49).

Antiparasitario

En ratones BALB/c inoculados con *Plasmodium chabaudi* y tratados con 250, 500 y 1000 mg/kg por vía oral, no se observaron diferencias importantes en la parasitemia, aunque

no desarrollaron el fenómeno de recrudescencia. Por otra parte las respuestas de anticuerpos contra *Plasmodium chabaudi* fue igual en ratones testigos y tratados (26).

Se desconoce el o los mecanismos de la *Spirulina* por los que ratones infectados con *P. Chabaudi* no presenten este fenómeno. Es probable que se estimule algún mecanismo antiparasitario que puede tardar varios días. Debido a que la producción de anticuerpos fue prácticamente igual en ratones tratados y testigos, se descarta la posibilidad de estimulación del sistema inmune (26).

Antitóxico

La *Spirulina* administrada a dosis de 800 mg/kg a ratones albinos Swiss antes y después del tratamiento con acetato de plomo, aumentó su tiempo de supervivencia y protegió del efecto del metal sobre el peso de los testículos, peso corporal y diámetro tubular de espermatogonias A y B, espermatocitos primarios y secundarios y espermátides (50).

Se ha observado que en la intoxicación con este metal, el ácido 5-aminolevulínico genera radicales libres de oxígeno que conducen a muerte celular (51) y por otra parte disminuye la síntesis de DNA (52). Al ser la *Spirulina* una fuente rica en antioxidantes y capaz de aumentar su síntesis (53), protege y evita el daño causado por este metal.

Antiviral

El Ca-SP, inhibió la replicación del virus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) y el de la inmunodeficiencia humana (HIV-1). La actividad anti HIV-1 del Ca-SP es similar a la del sulfato de dextrán (S-DEX), aunque más potente. La S-DEX tiene actividad anticoagulante, lo cual limita su utilización *in vivo*; sin embargo, el Ca-SP ofrece la ventaja de que posee actividad de ese tipo mucho menor, de tal forma que se podría alcanzar *in vivo* una actividad anti HIV-1 a concentraciones que no afecten la coagulación (14). En un estudio efectuado recientemente, Lee et al. (54), comprobaron que el reemplazo del ion Ca en la molécula del Ca-SP por los cationes sodio y potasio, mantenían la actividad viral, al contrario de los metales trivalentes, que la redujeron. Así mismo la depolimerización del complejo con sodio disminuyó dicha actividad.

El Ca-SP además de inhibir la replicación de HSV-1 y HIV-1, impide la de otros virus envueltos, tales como: citomegalovirus humano, virus del sarampión, paperas y de la influenza (15).

La actividad anti HIV-1 ha sido confirmada por otro grupo (55), que además de encontrarla en la fracción polisacáridica, se observó también en una fracción soluble en etanol y libre de polisacáridos y taninos.

Hernández Corona (56), había observado que el extracto acuoso del alga presentó actividad antiviral contra HSV-2, PRV, HCMV y adenovirus, respectivamente. Todo parece

indicar que afecta los eventos que ocurren durante las primeras dos horas del ciclo viral, que corresponden a la adsorción y penetración, sin afectar las etapas subsecuentes de biosíntesis (57, 58). Sin embargo, hasta donde se sabe, no se ha estudiado si tiene algún efecto en modelos de infección viral *in vivo*.

Siguiendo los enfoques modernos, no es sorprendente que los extractos de algunas algas muestren inhibición de la acción citopática del virus HIV-1 (59). En sí, algunos han sido efectivos contra HIV *in vivo* e *in vitro* y los agentes activos han resultado ser homopolisacáricos y heteropolisacáridos sulfatados, sulfoglicolípidos, carrageninas e hidroquinonas sesquiterpénicas (60). Tal es el caso de *Lyngbya lagerheimii* y *Phormidium tenue*. También se encontraron extractos de cianobacterias con propiedades inhibitorias a partir de *Phormidium cebennse*, *Oscillatoria raciborskii*, *Scytonema burmanicum*, *Calothrix elekinii* y *Anabaena variabilis* (28).

Cardiovascular

Se evaluó en ratas el efecto de la administración oral de *Spirulina* durante 2 semanas, sobre las respuestas vasomotoras de anillos de aorta con y sin endotelio, frente a la fenilefrina, tanto en presencia y ausencia de indometacina, o indometacina más el metil ester N ω -nitro-L-arginina y al carbacol. La *Spirulina* tuvo efecto sobre las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio y disminuyó el tono vascular al incrementar la síntesis y liberación de óxido nítrico así como de un eicosanoide vasodilatador dependiente de la ciclooxigenasa. También disminuyó la síntesis y liberación de un eicosanoide vasoconstrictor (61). Por otra parte, previno los efectos vasomotores causados por un dieta rica en fructosa, cuando fue administrada durante 6 semanas (62). Es probable que los efectos vasomotores del alga sean dependientes del endotelio. Resultados de un estudio llevado a cabo con el extracto etanólico de *Spirulina máxima*, sugieren que hay un aumento en la síntesis o producción de un prostanoide vasoconstrictor dependiente de ciclooxigenasa por las células del tejido vascular liso (63).

Hipoglicemiante

Lima Araujo (64) estudió el efecto de biomásas de *Spirulina* de diferentes orígenes, sobre la glicemia y tolerancia a la glucosa de ratas normales y diabéticas inducidas por aloxana. Las biomásas se adicionaron a las dietas, a concentraciones de 5% y 10%, que fueron administradas a los animales por 28 días, durante los cuales se determinó la glicemia. Al final se realizó una prueba oral de tolerancia a la glucosa en cada grupo. No se encontró diferencia significativa en los niveles glicémicos en los animales normales en relación a los testigos. En los animales diabéticos, se observó efecto hiperglicemiante en todos los

grupos alimentados con las biomásas.

Posteriormente se realizaron extracciones de una de las biomásas con diclorometano y metanol y los extractos obtenidos se administraron a ratas normales y diabéticas. El extracto diclorometánico presentó efecto hiperglicémico en las ratas normales y diabéticas, sugiriendo la presencia de un principio hiperglicémico en el extracto. El extracto metanólico presentó efecto hipoglicémico solamente en las ratas diabéticas, mostrando que además del principio hiperglicémico de baja polaridad, existe uno hipoglicémico de alta polaridad, pero cuyo efecto debe haber sido suprimido por aquel de la biomasa integral. En función de estos resultados y de otros previos relatados por Hosoyamada et al. (65), quien trabajó con las fracciones solubles e insolubles de *Spirulina*, agregadas a concentraciones del 20 % en la dieta de ratas, Lima Araujo (64) concluye que, posiblemente, las biomásas de distintas procedencias deben presentar diferentes propiedades, y que es necesaria la caracterización de las sustancias responsables de los efectos descritos.

Hipolipidémico

La actividad hipolipidémica de la *Spirulina* ha sido estudiada principalmente en rata, habiéndose encontrado en todos los trabajos efecto positivo (66, 67).

Recientemente, Torres-Durán et al. (37), comunicaron que el extracto oleoso y también el alga, exenta de grasa, proporcionados a ratas durante cinco días a concentraciones del 5% en la dieta, produjeron decremento de los lípidos hepáticos totales y triacilgliceroles. Además, no se observó aumento en el colesterol hepático, provocado por el tetracloruro de carbono. Por otra parte, las ratas que recibieron *Spirulina* completa en su dieta y se trataron únicamente con el vehículo, mostraron aumento en el colesterol-HDL.

Algunas algas como *Cystoseira barbata*, *Fucus gardnerii* y *Phyllophora nervosa*, han demostrado disminuir los niveles de colesterol plasmático, habiéndose aislado en algunos casos los principios activos responsables de tal actividad como son esteroides insaponificables y ácidos grasos. También se han estudiado los efectos de algas marinas verde-azules (*Monostroma nitidum*, *Ulva pertusa*, *Enteromorpha compressa* y *E. Intestinalis*) sobre el metabolismo del colesterol en ratas (28). Además, el colesterol hepático ha sido reducido hasta en un 50% por el alga en polvo y por el material extraído de ella con agua o disolventes; el residuo obtenido después de la extracción mostró los mejores efectos. De esos resultados se puede inferir que la fibra cruda de las algas representan el componente efectivo, hecho que también se ha observado con las algas marinas (28), lo que tratándose de dietas para el ser humano representaría el concepto más amplio de fibra dietética (68).

Inmunoestimulante

Se ha informado que el tratamiento de cultivos de macrófagos de pollo con un extracto de *Spirulina*, aumentó su capacidad fagocítica intrínseca, aunque no mejoró la de partículas opsonizadas. Además, los macrófagos tratados produjeron una sustancia soluble capaz de matar células tumorales (69).

El mismo grupo de investigadores también estudió el efecto de la adición de *Spirulina* a la dieta de pollos (70). Se encontró que la inmunización con eritrocitos de carnero (EC), produjo respuestas primarias de anticuerpos similares a la de los que recibieron dieta sin el alga; sin embargo, los pollos con dieta de *Spirulina* dieron mejores repuestas secundarias y mejores pruebas *in vivo* de inmunidad mediada por células; así mismo sus macrófagos presentaron mayor actividad fagocítica en cultivo y las células del bazo, una mayor actividad de células asesinas naturales.

En otro trabajo, Qureshi y Ali (71) observaron que si se adiciona extracto de *Spirulina* a cultivos de macrófagos alveolares de gato, fagocitan mejor a EC y a bacterias. Recientemente Hayashi et al. (17) describieron que la *Spirulina* tiene la capacidad de aumentar, en ratones, las respuestas de IgA cuando se administra antes o al mismo tiempo que el antígeno. También incrementó ligeramente la respuesta de IgG1 pero no modificó la de ningún otra clase o subclase de inmunoglobulina, incluyendo a la IgE.

El efecto de la *Spirulina* sobre el sistema inmune parece deberse a una estimulación importante de las actividades del macrófago. Es posible que también induzca su capacidad de funcionar como célula presentadora de antígeno, lo que explicaría los hallazgos de que la *Spirulina* administrada *in vivo*, mejora la respuesta inmune de anticuerpos (17,69,72). El macrófago estimulado por la *Spirulina* también podría producir citocinas en mayores cantidades, las cuales afectan la respuesta o actividad de otras células linfoides. Esto podría justificar varios hallazgos, como el de que la *Spirulina* sea mitogénica para células de bazo, que mejore su respuesta proliferativa a Concanavalina-A y que produzca un factor que provoque la muerte de células tumorales (71), hecho probablemente debido al TNF- α y a que los ratones tratados con *Spirulina* tengan una alta actividad de células NK (68). Este último efecto podría ser el resultado de la producción de IL-12, citocina sintetizada por macrófagos y que entre otras propiedades sea un potente activador de las células NK (73). Hay que considerar también que con los datos actuales no se puede descartar que la *Spirulina* actúe directamente sobre las células NK o induzca la producción de otras citocinas activadoras de las células NK. De cualquier forma, el efecto combinado de la producción de TNF- α y aumento de la actividad NK le conferiría posibles propiedades antitumorales. Sería interesante que se estudiara el efecto del alga sobre la producción de las citocinas producidas por

macrófagos y se caracterizara las moléculas que median este efecto.

CONCLUSION

La *Spirulina* y/o algunos de sus componentes poseen una diversidad de efectos farmacológicos que hacen de ella, además de un complemento alimenticio, una fuente atractiva y potencial para su empleo en el tratamiento de algunos padecimientos. La separación del o los principios activos, responsables de las diferentes actividades, puede constituir una alternativa farmacéutica.

REFERENCIAS

- Stein JR, Borden CA. Causative and beneficial algae in human disease conditions. A review. *Phycologia*, 1984; 23:485-501.
- Belay A, Kato T, Ota Y. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. *J Appl Phycol*, 1996; 8:303-311.
- Chamorro G, Salazar M, Salazar S. Estudio teratogénico de *Spirulina* en rata. *Arch Latinoamer Nutr*, 1989; 29:641-649.
- Chamorro G, Salazar M, Favila L, Bourges H. Estudio teratogénico de *Spirulina* en ratón. *Arch Latinoamer Nutr*, 1996; 40:86-94.
- Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Etude de la toxicité chronique de la *Spiruline* chez le rat. *Méd Nutr*, 1988; 24:104-106.
- Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Subchronic toxicity study in rats fed *Spirulina*. *J Pharm Belg*, 1988, 43:29-36.
- Salazar M, Salazar S, Steele CE, Chamorro G. *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri and postnatal development in rats. *Food Chem Toxicol*, 1996; 34:353-359.
- Salazar M, Martínez E, Madrigal E, Ruiz EL, Chamorro GA. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *J Ethnopharmacol*, 1998; 62:235-241.
- Cood GA, Bell SG, Brooks WP. Cyanobacterial toxins in water. *Wat Sci Tech*, 1989; 21:1-13.
- Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 1998; 352: 21-26.
- Cood GA. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Wat Sci Technol*, 1995; 32:149-156.
- Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J Appl Phycol*, 1993; 5:235-241.
- Chamorro G, Salazar M, Favila L, Bourges H. Farmacología y toxicología del alga *Spirulina*. *Rev Invest Clin*, 1996; 48:389-399.
- Hayashi K, Hayashi T, Kojima I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1996; 12:1463-1471.
- Hayashi T, Hayashi K, Maeda M, Kojima I. Calcium spirulan, as inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J Nat Prod*, 1996; 59:83-87.
- Lee JB, Hayashi T, Hayashi K, Sankawa U, Maeda M, Nemoto T, Nakanishi H. Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*. *J Nat Prod*, 1998; 61:1101-1104.
- Hayashi O, Hirahashi T, Katoh T, Miyajima H, Hirano T, Okuwaki Y. 1998. Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), 1998; 44:841-851.
- Yang HN, Lee EH, Kim HM 1997. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sci*, 1998; 61:1237-1244.
- Kim HM., Lee EH, Cho HH, Moon YH. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Spirulina*. *Biochem Pharmacol*, 1998; 55:1071-1076.
- Kapoor R, Mehta U. Supplementary effect of *Spirulina* on hematological status of rats during pregnancy and lactation. *Plant Foods Hum Nutr*, 1998; 52:315-324.
- Kapoor R, Mehta U. Utilization of β -carotene from *Spirulina platensis* by rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 1993; 43:1-7.
- Halvorsen R, Flesland O. Pregnancy and iron storage. *Tidss Laeg*, 1990; 110: 3222-3224.
- Kaneshige E. Serum ferritin as an assessment of iron stores and other hematologic parameters during pregnancy. *Obstet Gynaecol*, 1981; A57: 238-242.
- Mishima T, Murata J, Toyoshima M, Fujii H, Nakajima M, Hayashi T, Kato T, Saiki I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (CA-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis*, 1998; 16:541-550.
- Mittal A., Kumaar PV, Banerjee S, Rao AR, Kumar A. Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on carcinogen metabolizing enzymes in Swiss albino mice. *Phytother Res*, 1999; 13:111-114.
- Ramírez Villa C. Efecto de *Spirulina* sobre la resistencia de ratones a paludismo y cáncer. 49p. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México, 1997.
- Fedkovic Y, Astre C, Pinguet F, Gerber M, Ychou M, Pujol H. 1993. *Spiruline* et cancer. *Bull Inst Ocean*, 1999; 12:117-120.
- Becker EW. *Microalgae. Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. Cambridge, 1995, p. 196.
- Richmond A, Becker EW. Technological aspects of mass cultivation – a general outline. En *Handbook of microalgae mass culture*, ed. A. Richmond, pp. 245-263. CRS Press, Boca Ratón, 1986.
- Schwartz JL, Slar G. Regression of experimental hamster cancer by beta caroteno and algae extracts. *J Oral Maxillofac Surg*, 1987; 45:510-515.
- Schwartz JL, Slar G, Reid S, Trichler D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. *Nutr Cancer*, 1988; 11:127-134.
- Hayakawa Y, Hayashi T, Hayashi K, Hayashi T, Ozawa T, Niiya K, Sakuragawa N. Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996; 7:554-560.

33. Hayakawa Y, Hayashi T, Hayashi K, Ozawa T, Niiya K, Sakuragawa N. Calcium spirulan as an inducer of tissue-type plasminogen activator in human fetal lung fibroblasts. *Biochem Biophys Acta*, 1997; 1355:241-247.
34. Paz-González MVR. 1997. Estudio de los pigmentos presentes en extractos obtenidos del alga *Spirulina* y su efecto antigenotóxico. 109.-p. Tesis. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro Santiago de Querétaro, México.
35. De Flora S. 1998. Mechanisms of inhibitor of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 1997; 402:151-158.
36. Qishen P, Coleman A, Baojiang G. Radioprotective effect of extract from *Spirulina platensis* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test. *Toxicology Lett*, 1989; 48:165-169.
37. Torres-Durán PV, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal MC, Mascher D, Blé-Castillo J, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *J Ethnopharmacol*, 1998; 64:141-147.
38. Miranda MS, Cintra RG, Barros SB, Manini FJ. Antioxidant activity of microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 8:1075-1079.
39. Romay Ch, González R. Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocyte against lysis by peroxy radicals. *J. Pharm. Pharmacol*, 2000; 52:367-368.
40. Bhat VH, Madyastha KM. E-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Comm*, 2000; 275:20-25.
41. Torres-Durán PV, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal MC., Mascher D, Diaz-Zagoya, JC, Juárez-Oropeza MA. *Spirulina maxima* prevents induction of fatty by carbon tetrachloride in the rat. *Biochem Mol Bio Int*, 1998; 44:768-793.
42. Vadiraja HB, Gaikwad NW, Madyashta KM. Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated. *Biochem Biophys Res Comm*, 1998; 249:428-431.
43. Kay RA. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci*, 1991; 30:555-573.
44. Durand-Chastel H. 1997. Production of *Spirulina* rich in GLA and sulfolipids. (1997). International symposium marine cyanobacteria and related organisms. Institut Océanographique Paris. November 24-28.
45. Romay C, Armesto J, Remírez D, González R, Ledón N, García I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm Res*, 1998; 47:36-41.
46. Romay C, Ledón N., González R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res*, 1998; 47:334-338.
47. Romay C, Ledón N., González R. Phycocyanin extract reduces leukotriene B₄ levels in arachidonic acid-induced mouse-ear inflammation test. *J Pharm Pharmacol*, 1999; 51:641-642.
48. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 1996; 12:274-277.
49. González R, Rodríguez S, Romay C, Ancheta A, González A, Armesto J, Remírez D, Merino N. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic-induced colitis in rats. *Pharmacol Res*. 1999; 39:55-59.
50. Shastri D, Kumar M, Kumar A. Modulation or lead toxicity by *Spirulina fusiformis*. *Phytother Res*, 1999; 13:258-260.
51. Monteiro HP, Abdalla DSP, Augusto O, Bechar, EJM. 1998. Free radical generation during delta amino laevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connection with porphyringathins. *Arch Biochem Biophys*, 1999; 271: 206-261.
52. Kacev S, Singhal RL. Aspects of molecular mechanisms underlying the biochemical toxicology of lead. En *Lead Toxicity*, ed. By R.L. Seinghal and J.A. Thomas, pp. 237-227. Urban and Scharzenberg, Baltimore-Munich, 1980.
53. Bethold HK., Crain PF, Gouni J, Reeds PJ, Klein PD. Evidence for incorporation of intact dietary pyrimidine (but no purine) nucleosides into hepatic RNA and DNA. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1995; 92:10123-10127.
54. Lee JB, Srisomporn P, Hayashi K, Tanaka T, Sankawa U, Hayashi T. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide form *Spirulina maxima platensis*, on antiviral activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2001; 49:108-110.
55. Ayeahunie S, Belay A, Baba, TW. Ruprecht RM. 1998. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis (Arthrospira platensis)*. *J Acq Imm Def Syndr Hum Retrovirol* 2001; 18:7-12.
56. Hernández Corona A. 1998. Estudio del potencial antiviral de *Spirulina maxima* . p. 84. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México.
57. Nieves-Muñoz J. 1998. Efecto de un extracto acuoso de *Spirulina máxima* sobre virus que utilizan el receptor celular heparán-sulfato. p.48. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
58. Hayashi K, Hayashi T, Morita N. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of Herpes simplex virus type I. Penetration into HeLa cells. *Phytother Res*, 1993; 7:76-80.
59. Gustafson KR, Cardellina II JH, Fuller RW, Weislow OS, Kiser RF, Snader KM, Patterson GML, Boyd MR. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (Blue-Green Algae). *J Natl Canc*, 1989; 81:1254-1258.
60. Schaeffer DJ, Krylov VS. Anti-HIV activity of extrats and compounds from algal and cyanobacteria. *Ecotoxicol Environm Safety*, 2000; 45:208-227.
61. Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Díaz-Zagoya JC, Mascher D, Juárez-Oropeza MA. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Life Sci*, 1997; 61:PL 211-219.
62. Paredes-Carbajal MC, Torres-Duran PB, Rivas-Arancibia S, Zamora-Gonzalez J, Mascher D, Juarez-Oropeza MA. 1998. Effects of dietary *Spirulina máxima* on vasomotor of aorta rings from rats fed a fructose-rich diet. *Nutr Res*, 18: 1997; 1769-1782.
63. Paredes-Carbajal MC, Torres Durán PV, Díaz-Zagoya JC, Mascher D, Juárez-Oropeza MA. Effects of the ethanolic extract of *Spirulina máxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *J Ethnopharmacol*, 2001; 75: 37-44.

64. Lima KG, Facchinetti AD, Santos CP. Efeitos de diferentes extractos de *Spirulina* sobre os parâmetros glicêmicos de ratos normais e diabéticos. III Simposio Latino Americano de Ciencia de Alimentos. Campinas, Brasil, 16 al 19 de Noviembre, 1999.
65. Hoyosomada Y, Takay Y, Kato T. Effects of water-soluble and water-insoluble fractions of *Spirulina* on serum lipids components and glucose tolerance in rats. J Jpn Soc Nutr Food Sci, 1991; 44:273-277.
66. Devi MA, Venkataraman LV. Hypocholesterolemic effect of blue green alga *Spirulina platensis* in albino rats. Nutr Rep Int 1983; 28:519-530.
67. González de Rivera C, Miranda-Zamora R, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. Preventive effect of *Spirulina máxima* on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat, a preliminary report. Life Sci, 1993; 53:57-61.
68. Lee SC, Prosky L. Dietary fiber analysis for nutrition labeling. Cereal. Food World, 1992; 37:765-771.
69. Qureshi MA, Kidd MT, Ali RA. *Spirulina platensis* extract enhances chicken macrophage functions after in vitro exposure. J Nutr Immunol, 1995; 3:35-45.
70. Qureshi MA, Garlich JD, Kidd MT. Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1996; 18:465-476.
71. Qureshi MA, Ali RA. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1996; 18:457-463.
72. Hayashi O, Katoh T, Okuwaki Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. J Nutr Sci Vitaminol, 1994; 40:431-441.
73. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. Immunology Today, 1993; 14:335-339.

Recibido:03-08-2001

Aceptado:16-04-2002

Crenças sobre as vitaminas e consumo de produtos vitamínicos entre universitários de São Paulo

Karina Maria Olbrich dos Santos, Antônio de Azevedo Barros Filho

Universidade São Judas Tadeu - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil

RESUMO. Com o objetivo de conhecer as crenças sobre as vitaminas e verificar sua relação com o consumo de produtos vitamínicos, um inquérito por amostragem foi realizado entre os estudantes ingressantes de uma universidade privada em São Paulo. As crenças foram abordadas através de 19 proposições sobre a relação vitaminas-saúde; a concordância/discordância dos respondentes foi expressa em escala de 5 pontos. A consistência interna do conjunto de proposições foi avaliada pelo coeficiente alfa de Cronbach. Dos 894 respondentes, 30,4% consumiu produtos vitamínicos regular ou esporadicamente nos 3 meses precedentes. 94,5% acredita que a vitamina C previne gripes e resfriados e 72,5% considera as vitaminas fonte de energia. Parcela importante considera que um excesso de vitaminas pode acarretar riscos à saúde. O escore total de crenças dos consumidores regulares foi maior que o dos não consumidores ($p < 0,001$). Os resultados indicam que benefícios cientificamente controversos são atribuídos às vitaminas pelos universitários considerados e sugerem haver relação entre crenças e consumo de produtos vitamínicos.

Palavras chaves: Crenças, vitaminas, suplementação vitamínica, produtos vitamínicos.

SUMMARY. Vitamin beliefs and consumption of vitamin supplements among university students in the city of São Paulo.

A survey was conducted in a sample of 894 students entering a private university in São Paulo to examine the vitamin beliefs and to verify the relation between vitamin beliefs and vitamin supplements consumption. Nineteen statements about the relation between vitamins and health were developed to assess the beliefs; the respondents answered by means of a 5-point agreement scale. Cronbach's alpha coefficient of internal consistency was determined for the total scale. 94.5% of students believe that vitamin C prevents and cures the common cold and 72.5% consider vitamins as an energy source. Many students recognize the possibility of health risks associated to excessive vitamin consumption. Vitamin supplement users had a belief score higher than non-users ($p < 0.001$). The results indicate that several misconceptions about vitamin benefits are common among the students and suggest a relation between vitamin beliefs and supplements consumption.

Key words: Beliefs, vitamins, vitamin supplements

INTRODUÇÃO

A relação entre vitaminas e saúde tem estado presente na mídia com relativa frequência. A imprensa tem destacado os resultados de pesquisa sobre a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, abordado o risco de efeitos tóxicos associados à ingestão excessiva de medicamentos à base de vitaminas e apontado as incertezas a respeito de seus efeitos benéficos além da satisfação de necessidades nutricionais. Também têm sido publicados artigos que defendem a suplementação da dieta com produtos vitamínicos.

A publicidade de produtos vitamínicos e outros suplementos nutricionais no Brasil, como em diferentes partes do mundo, tem atribuído às vitaminas diversos benefícios para a saúde, muitos dos quais não estão fundamentados pela ciência. Supostos benefícios aparecem em destaque nos comerciais veiculados pela televisão e na publicidade em revistas: vitaminas contra estresse e cansaço, fornecendo energia "extra" para atividades cotidianas, evitando gripes e resfriados. Estão também presentes em folhetos e nos rótulos

de produtos disponíveis em supermercados, segundo os quais, por exemplo, a vitamina E "previne o envelhecimento" e a vitamina C "previne as infecções em geral, reforçando as defesas do organismo". Nesse sentido cabe a observação de Barros (1) sobre a atuação eficiente da publicidade desses produtos, atribuindo-lhes funções simbólicas que os associam a fontes de vigor e energia em um grau que aparentemente não existe nas fontes naturais de vitaminas, os alimentos.

À parte o debate e as incertezas científicas sobre a ação das vitaminas na prevenção de doenças, fica como questão se as informações que circulam nos meios de comunicação de massa - e quais delas - têm sido incorporadas às concepções populares sobre esses nutrientes. As vitaminas têm, como afirma Bernier (2) uma "excelente reputação" entre a população, sendo consideradas necessárias e inofensivas, e isso pode resultar na assimilação preferencial de informações sobre possíveis benefícios, estimulando o consumo de produtos vitamínicos sem a necessidade de suplementação da dieta. Estudos em diferentes grupos populacionais têm associado o consumo difundido desses produtos a crenças

populares sobre efeitos benéficos das vitaminas (3,4). Paralelamente, seu uso indiscriminado por pessoas saudáveis vem sendo criticado na literatura, tanto pela ausência de comprovação dos efeitos almejados pelos consumidores, como pela possibilidade de riscos à saúde associados à ingestão excessiva de algumas vitaminas (2,5).

Em um levantamento nas bases de dados MEDLINE e LILACS (1990-1999) não foram encontrados estudos que abordassem as crenças sobre as vitaminas ou avaliassem a extensão do consumo de produtos vitamínicos no Brasil. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo conhecer as crenças sobre as vitaminas comuns entre uma população de universitários de São Paulo e verificar a existência de relação com o consumo de produtos vitamínicos nesse grupo populacional.

METODOLOGIA

O levantamento das informações foi realizado por intermédio de um questionário estruturado, submetido a pré-teste com alunos da mesma universidade. Uma amostra representativa dos estudantes de 1º ano das áreas de Ciências Humanas, Exatas e Biológicas de uma universidade privada localizada no Município de São Paulo constituiu a população da pesquisa. A amostra foi selecionada por sorteio de conglomerados, constituídos pelas diversas turmas dos cursos de cada área.

As “crenças sobre as vitaminas” foram definidas como um conjunto de concepções sobre a importância e os efeitos desses nutrientes sobre a saúde e abordadas por intermédio de 19 proposições relacionais a esse respeito. A concordância ou discordância quanto ao conteúdo de cada proposição foi expressa pelo respondente em escala com 5 categorias de resposta (de “discordo totalmente” a “concordo totalmente”), que incluiu uma categoria central para indicar neutralidade ou desinformação a respeito (“indeciso/não sei”). Considerou-se que a concordância com o conteúdo de uma proposição – mais intensa ou menos intensa – indicava que seu conteúdo era considerado verdadeiro pelo respondente, e vice-versa.

As proposições foram estabelecidas através de três procedimentos: (a) coleta de opiniões espontâneas de 30 estudantes da mesma universidade – aos quais solicitou-se que listassem as primeiras 5 propriedades das vitaminas que lhes ocorressem – seguida de seleção das mais frequentes; (b) seleção de informações comumente presentes na publicidade e rotulagem de produtos vitamínicos e (c) identificação de propriedades e efeitos tóxicos das vitaminas recentemente investigados, com base em revisão da literatura. As sentenças selecionadas foram reformuladas segundo as recomendações de Foddy (6) e Mueller (7) para a construção de escalas de múltiplos itens. Todas abordam aspectos cognitivos referentes à relação entre vitaminas e saúde e

podem ser consideradas corretas ou não do ponto de vista do conhecimento científico atual.

A frequência de consumo de produtos vitamínicos (multivitamínicos com ou sem minerais, combinações de vitaminas antioxidantes, vitamina A ou beta-caroteno, vitamina C, vitamina E e vitaminas do complexo B) nos 3 meses precedentes foi abordada em questões fechadas. Esse período foi considerado suficiente para o levantamento do uso esporádico desses produtos e adequado ao dimensionamento do consumo regular, cuja frequência pode alterar-se em períodos longos. No questionário, o termo “suplemento vitamínico” foi empregado genericamente para designar os produtos à base de vitaminas, sem distinção de dosagem. Supôs-se que, popularmente, ainda não havia sido assimilada a distinção estabelecida pelo Ministério da Saúde, que restringiu o termo “suplemento vitamínico” a produtos com doses de no máximo 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) e definiu como “medicamentos à base de vitaminas” os produtos que excedem esse limite (13,14).

O levantamento dos dados foi realizado em abril de 1999. Os questionários foram auto-administrados nas próprias salas de aula, mediante o consentimento pós-informação por parte dos estudantes. Poucos não se dispuseram a participar: menos de 2% do total da amostra. Ao todo, 894 questionários foram considerados suficientemente respondidos: 250 da área de Ciências Biológicas, 320 de Ciências Humanas e 324 de Ciências Exatas.

A análise estatística foi realizada por intermédio do SPSS (versão 8.0) e do SAS (versão 6.12). Para cada proposição, foram determinadas a frequência e a proporção das alternativas de resposta, assim como a média dos pontos a elas atribuídos (de 1 = discordo totalmente a 5 = concordo totalmente). Para minimizar a tendência geral de concordância pelos respondentes (6,7), algumas sentenças negavam a existência de determinado benefício e a contagem dos pontos foi invertida; o mesmo foi feito para as sentenças que abordavam riscos à saúde associados ao excesso de vitaminas. A proporção de estudantes que concordou com o conteúdo (ou discordou) de uma proposição foi considerada como indicador da amplitude da difusão da crença nela expressa; seu escore médio em um grupo foi interpretado como indicador da tendência do grupo em considerá-la verdadeira. O escore médio foi utilizado para comparações entre grupos delimitados por gênero, área do curso e consumo de produtos vitamínicos, através de análise de variância.

O conjunto de proposições compôs uma escala de múltiplos itens, do tipo Likert. A soma dos pontos atribuídos a todas as proposições definiram o escore total do respondente, interpretado como uma medida única de suas crenças sobre as vitaminas. A consistência interna da escala – uma medida de sua confiabilidade – foi avaliada por intermédio do coeficiente alfa de Cronbach (7,10). Com base

no cálculo desse coeficiente, itens que reduziam a consistência interna da escala foram desconsiderados, visando aumentar sua confiabilidade. O escore total foi utilizado para a comparação entre grupos através de análise de variância.

Como a amostra total não foi proporcional às 3 áreas dos cursos, as respostas foram analisadas mediante a ponderação por área. No entanto, a análise ponderada dos dados referentes ao consumo de produtos vitamínicos e às crenças não diferiu da não ponderada e, por simplicidade, são apresentados os resultados sem a ponderação.

RESULTADOS

As características da amostra são apresentadas na Tabela 1. Os sujeitos da pesquisa concentram-se na faixa etária dos 17 aos 24 anos (85,0%), são residentes no Município ou Região Metropolitana de São Paulo (99,6%) e solteiros (90,7%). A distribuição entre os gêneros é relativamente equilibrada. A maioria dos estudantes (59,8%) trabalha além de estudar e cerca de 15% são fumantes.

TABELA 1
Características da amostra

		N	%
Sexo	Feminino	395	44,2%
	Masculino	498	55,8%
Faixa etária	17-19 anos	486	54,4%
	20-24 anos	274	30,6%
	25-29 anos	79	8,8%
	30 anos ou mais	55	6,2%
Trabalho	Sim	533	59,8%
	Não	358	40,2%
Prática de exercícios físicos	Não pratica (até 1 vez/semana)	500	55,9%
	2-3 vezes/semana	235	26,3%
	4-7 vezes/semana	159	17,8%
Tabagismo	Fumante	137	15,3%
	Ex fumante	67	7,5%
	Não fumante	690	77,2%

N total = 894

Nos 3 meses precedentes, 30,4% (IC 95% 27,4 - 33,4) dos estudantes consumiu produtos vitamínicos (Tabela 2). A maior parte os consumiu pelo menos uma vez por semana, definindo o grupo dos consumidores regulares. Cerca de 6,0% usou esses produtos 1-2 vezes por mês ou quando considerou necessário, sendo classificado com consumidor esporádico.

TABELA 2
Prevalência de consumo de produtos vitamínicos

	N	%	% válidos (I:C: 95%)
Consumidores regulares	203	22,7	23,12 (20,33 - 25,90)
Consumidores esporádicos	53	5,9	6,03 (4,46 - 7,61)
Não consumidores	622	69,6	70,84 (67,83 - 73,84)
Total	878	98,2	100,0
Perdas		1,8	
Total	894	100,0	

a Estudantes que consumiram produtos vitamínicos uma ou mais vezes por semana nos 3 meses anteriores à pesquisa.

b Estudantes que consumiram produtos vitamínicos menos de uma vez por semana ou sem regularidade, nos 3 meses anteriores à pesquisa.

c Consumidores que não indicaram a frequência de consumo.

A Tabela 3 apresenta a proporção (%) das 5 alternativas de resposta a cada proposição e o escore médio obtido. Nota-se que o conteúdo das proposições B8 e T5 é pouco difundido entre os estudantes: a maioria assinalou a alternativa "não sei/indeciso". Isso refletiu no escore médio dessas sentenças, próximo de 3, o número de pontos atribuído a essa alternativa. O mesmo ocorreu com as proposições que receberam uma proporção equilibrada de concordância e discordância, como as proposições B2, N3 e N4, indicando tendência de indecisão ou desconhecimento ao nível do grupo de respondentes. Já a proposição B10, que relaciona a vitamina C à prevenção e combate de gripes e resfriados, recebeu a concordância de quase a totalidade dos estudantes - 94,5% indicaram concordar ou concordar totalmente. A alta proporção (43,7%) de "concordo totalmente" resultou em um escore médio alto: 4,3. Outra propriedade atribuída às vitaminas por grande parte dos respondentes é a de fornecer energia: 72,5% discordaram ou discordaram totalmente da sentença que negava essa propriedade (B9). Grande parte dos estudantes indicou concordar ou concordar totalmente com 2 das afirmações que sugerem a existência de riscos à saúde associados ao consumo de vitaminas em excesso, T2 e T4. Como essas proposições foram consideradas negativas na contagem dos pontos atribuídos às respostas, a alta concordância refletiu-se em escore médio relativamente baixo.

Os itens B8 e T5 reduziam a consistência interna da escala constituída pelo conjunto de proposições medida pelo alfa de Cronbach e, por isso, foram eliminados do cálculo do escore total. Assim, a escala final utilizada para medida das crenças passou a conter 17 itens e apresentou alfa de 0,65. O cálculo do escore total considera apenas os estudantes que responderam a todas as proposições.

TABELA 3
Proporção das respostas (%) e escore médio das proposições sobre vitaminas

	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	Escore médio (desvio padrão)
B1 As vitaminas são essenciais para evitar doenças de carência nutricional como o raquitismo e o escorbuto (+)	,7	5,5	14,0	57,8	21,9	4,0 (0,8)
B2 As vitaminas não têm efeito contra doenças como o câncer (-)	6,4	19,9	46,7	21,9	5,1	3,0 (0,9)
B3 As vitaminas ajudam a melhorar o raciocínio (+)	1,9	10,9	24,9	50,2	12,1	3,6 (0,9)
B4 Algumas vitaminas podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares (+)	1,0	5,0	37,9	46,8	9,3	3,6 (0,8)
B5 Não adianta tomar grandes doses de vitaminas para retardar o envelhecimento (-)	14,9	46,5	22,1	13,4	3,1	2,4 (1,0)
B6 As vitaminas não ajudam a combater o estresse (-)	2,3	14,9	33,8	38,5	10,6	3,4 (0,9)
B7 O sistema imunológico é fortalecido pelas vitaminas (+)	1,0	5,6	32,2	48,6	12,6	3,7 (0,8)
B8 As vitaminas antioxidantes combatem radicais livres associados a doenças graves (+)	,3	4,1	79,9	13,6	2,1	3,1 (0,5)
B9 As vitaminas não são fonte de energia para o organismo (-)	3,4	12,4	11,7	49,8	22,7	3,8 (1,0)
B10 A vitamina C ajuda a prevenir e combater gripes e resfriados (+)	1,1	2,4	2,0	50,7	43,7	4,3 (0,7)
N1 Pessoas que praticam exercícios físicos precisam de suplementos vitamínicos para repor as perdas (+)	4,1	19,1	6,4	48,3	22,1	3,7 (1,1)
N2 Suplementos vitamínicos ajudam os fumantes a manter a saúde (+)	21,3	35,0	31,1	11,0	1,6	2,4 (1,0)
N3 Quem estuda e trabalha precisa de suplementos vitamínicos mesmo que tenha uma alimentação equilibrada (+)	8,7	33,2	13,6	37,6	6,9	3,0 (1,2)
N4 Viver em ambiente poluído aumenta a quantidade necessária de vitaminas (+)	7,9	20,7	32,7	34,7	4,1	3,1 (1,0)
T1 Tomar grandes doses de vitamina C não causa danos ao organismo (+)	14,1	32,9	28,4	19,2	5,3	2,7 (1,1)
T2 Suplementos vitamínicos só devem ser usados com acompanhamento médico (-)	30,4	45,3	7,0	14,9	2,4	2,1 (1,1)
T3 Quanto mais vitaminas o organismo tiver disponível, melhor para a saúde (+)	4,9	23,7	20,6	39,4	11,4	3,3 (1,1)
T4 O uso prolongado de grandes doses de vitaminas pode prejudicar a saúde (-)	20,0	44,9	25,8	7,4	1,9	2,3 (0,9)
T5 O excesso de vitamina A acumula-se no organismo e causa problemas de saúde (-)	1,5	5,2	66,7	21,0	5,6	3,2 (0,7)

B = benefícios das vitaminas; N = aumento da necessidade de vitaminas em determinadas condições; T = risco de efeitos tóxicos.

Os sinais (+) e (-) indicam as proposições consideradas positivas e negativas. Para as proposições positivas, 1= discordo totalmente; 2= discordo; 3= não sei/indeciso; 4= concordo; 5= concordo totalmente. Para as negativas, a contagem foi invertida: 1= concordo totalmente; (...) 5= discordo totalmente.

A comparação do escore médio das proposições entre os gêneros só encontrou diferença no caso da proposição B9: o escore médio dos estudantes do sexo masculino (3,7) diferiu do escore do sexo feminino (3,9) ao nível de 0,05. A diferença, entretanto, se dá apenas na intensidade e não na direção da crença: ambos os escores são próximos a 4 indicando tendência de discordância, pois a proposição é negativa.

Foi encontrada diferença entre os escores médios das proposições N3, T2 e T4 ($p < 0,05$) e entre o escore total da escala de crenças ($p < 0,01$) dos estudantes das 3 áreas de curso. No caso da sentença N3 os escores dos 3 grupos foram próximos de 3, mas pelo teste de Tukey os estudantes da área de Biológicas apresentaram em média escore menor que os das outras áreas. A proposição T4 também obteve escore médio próximo de 3 e foi encontrada diferença entre Biológicas e Humanas. Os estudantes das 3 áreas tenderam a concordar com a afirmação “suplementos vitamínicos só devem ser usados com acompanhamento médico” (T2) mas, comparativamente, os estudantes da área de Biológicas apresentaram escore médio menor que os de Humanas. O escore total de crenças foi menor entre os estudantes de Ciências Biológicas.

A relação entre as crenças sobre as vitaminas e o consumo de produtos vitamínicos foi examinada mediante a comparação dos escores de crença dos consumidores regulares e dos não consumidores, por análise de variância. A Tabela 4 apresenta os escores médios de cada proposição e o escore total da escala de crenças de cada grupo, indicando as diferenças estatísticas encontradas. Em todos os casos em que foi detectada diferença (B4, B5, B6, B7, N1, N3, N4, T1 e T2), o escore médio da proposição foi maior no grupo dos consumidores regulares. O mesmo ocorreu com o escore total, que foi significativamente maior entre os consumidores regulares.

DISCUSSÃO

Os resultados indicam que, de modo geral, os universitários considerados na pesquisa têm uma visão bastante positiva das vitaminas e dos produtos vitamínicos. Diversas propriedades benéficas – nem todas comprovadas cientificamente, praticamente todas encontradas na publicidade desses produtos – são atribuídas às vitaminas por parcela relevante dessa população. A grande maioria tende a acreditar, por exemplo, que as vitaminas são fonte de energia – o que não é correto do ponto de vista científico. Quase todos os sujeitos da pesquisa acreditam que a vitamina C atua na prevenção e tratamento de gripes e resfriados, embora revisões recentes da literatura científica concluam que não é possível atribuir à vitamina C um papel na prevenção e/ou tratamento dessas doenças (11).

A possibilidade de riscos à saúde devido ao consumo de doses excessivas de vitaminas é reconhecida por parcela importante dos estudantes. A grande maioria indicou acreditar que a suplementação vitamínica deve ocorrer com acompanhamento médico e que o uso prolongado de grandes doses de vitaminas oferece riscos à saúde. No entanto, sentenças que abordavam a toxicidade de vitaminas específicas receberam menos crédito. Por exemplo, menos da metade acredita que grandes doses de vitamina C possam causar danos à saúde e apenas 6,7% informou acreditar na possibilidade de risco à saúde associado ao excesso de vitamina A.

Algumas limitações associadas à metodologia da pesquisa devem ser consideradas na análise dos resultados. O fato da coleta dos dados ter sido realizada por meio de um questionário auto-administrado os condiciona à interpretação das questões pelos respondentes. Expressões como “grandes doses” e “excesso”, por exemplo, podem ter sido interpretadas diferentemente. Segundo Foddy (6) é freqüente a coexistência de diversas interpretações, mesmo para palavras e expressões comuns.

É relevante considerar também limitações associadas ao uso de um conjunto de proposições e uma escala com 5 alternativas de resposta para a abordagem das crenças. Foddy (6) afirma que, quando as mesmas categorias de resposta são usadas para uma bateria de proposições, seu significado pode variar de uma sentença à outra e de um respondente para outro, pois não há um padrão explícito de referência. Além disso, algumas pessoas tendem a usar mais as categorias extremas enquanto outras tendem a evitar essas categorias. Nesta pesquisa, notou-se que a maioria evitou assinalar “concordo totalmente” e “discordo totalmente”, dificultando a diferenciação dos respondentes. O fato das sentenças tratarem de informações adquiridas, muitas vezes, informalmente, pode ter contribuído para esse perfil de respostas. Segundo Foddy, o uso de um número maior de categorias (7 ou 9) pode favorecer a discriminação de grupos de respondentes. A opção pela escala de 5 pontos fundamentou-se em seu uso nos estudos publicados sobre crenças e conhecimento em nutrição (3,4,12).

O conjunto de proposições compôs uma escala de consistência interna moderada, de acordo com o coeficiente alfa de Cronbach obtido, 0,65. A literatura que aborda o uso de escalas de múltiplos itens para medida de construtos como atitudes e crenças tem considerado que uma boa escala apresenta um alfa de 0,80 ou mais (7,10). No entanto, segundo Mueller (7), uma consistência interna moderada (alfa acima de 0,4) é aceitável para a comparação dos escores médios de grupos de 100 ou mais respondentes, pois erros na medida dos indivíduos serão balanceados no grupo.

TABELA 4

Escores médios das proposições sobre as vitaminas e escore total da escala de crenças de consumidores regulares e de não-consumidores de produtos vitamínicos

	Consumidores regulares			Não consumidores		
	N	Escore médio	Desvio padrão	N	Escore médio	Desvio padrão
B1 As vitaminas são essenciais para evitar doenças de carência nutricional como o raquitismo e o escorbuto (+)	201	4,0	,78	614	4,0	,81
B2 As vitaminas não têm efeito contra doenças como o câncer (-)	200	3,0	,91	609	3,0	,95
B3 As vitaminas ajudam a melhorar o raciocínio (+)	202	3,7	,89	611	3,6	,90
B4 Algumas vitaminas podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares (+)	200	3,8***	,74	612	3,5***	,78
B5 Não adianta tomar grandes doses de vitaminas para retardar o envelhecimento (-)	198	2,7*	1,03	614	2,4*	,99
B6 As vitaminas não ajudam a combater o estresse (-)	199	3,6**	,93	615	3,3**	,94
B7 O sistema imunológico é fortalecido pelas vitaminas (+)	200	3,8***	,81	614	3,6***	,80
B9 As vitaminas não são fonte de energia para o organismo (-)	202	3,9	1,03	613	3,8	1,05
B10 A vitamina C ajuda a prevenir e combater gripes e resfriados (+)	202	4,4	,75	616	4,3	,74
N1 Pessoas que praticam exercícios físicos precisam de suplementos vitamínicos para repor as perdas (+)	200	4,0***	,94	610	3,6***	1,18
N2 Suplementos vitamínicos ajudam os fumantes a manter a saúde (+)	202	2,5	1,07	612	2,3	,96
N3 Quem estuda e trabalha precisa de suplementos vitamínicos mesmo que tenha uma alimentação equilibrada (+)	201	3,4***	1,16	615	2,9***	1,13
N4 Viver em ambiente poluído aumenta a quantidade necessária de vitaminas (+)	202	3,2*	1,05	615	3,0*	1,01
T1 Tomar grandes doses de vitamina C não causa danos ao organismo (+)	201	2,8*	1,15	610	2,6*	1,07
T2 Suplementos vitamínicos só devem ser usados com acompanhamento médico (-)	201	2,5***	1,17	613	2,0***	1,02
T3 Quanto mais vitaminas o organismo tiver disponível, melhor para a saúde (+)	200	3,3	1,13	614	3,3	1,09
T4 O uso prolongado de grandes doses de vitaminas pode prejudicar a saúde (-)	201	2,4	,98	614	2,2	,91
Escore total	184	56,9***	6,0	557	53,5***	6,3

B = benefícios das vitaminas; N = aumento da necessidade de vitaminas em determinadas condições; T = risco de efeitos tóxicos.

Os sinais (+) e (-) indicam as proposições consideradas positivas e negativas. Para as proposições positivas, 1= discordo totalmente; 2= discordo; 3= não sei/indeciso; 4= concordo; 5 = concordo totalmente. Para as negativas, a contagem foi invertida: 1= concordo totalmente; (...) 5= discordo totalmente.

Nível de significância da diferença entre as médias: * p< 0,05; ** p<0,01; *** p< 0,001

Alguns resultados do presente levantamento assemelham-se aos encontrados nos EUA. Entre universitários, Eldridge e Sheehan (3) constataram, por exemplo, que a maioria acreditava no efeito preventivo da vitamina C sobre a gripe e na ação de doses extras de vitaminas aumentando a vitalidade e energia. Entre estudantes do ensino médio, Thomsen *et al.* (12) verificaram que cerca da metade dos participantes acreditava que uma pessoa que se sente cansada provavelmente necessita de mais vitaminas e minerais e que a grande maioria discordava da afirmação de que esses nutrientes possam ser consumidos com segurança em qualquer quantidade.

Observou-se que a possível atuação das vitaminas na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis divide a opinião dos estudantes. Embora a maioria considere que algumas vitaminas podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares, quase 40% respondeu que não sabe ou está indeciso a esse respeito. A sentença sobre a relação entre vitaminas e câncer também recebeu alta proporção de “não sei/indeciso” e, nesse caso, a outra metade dos estudantes dividiu-se em concordar ou não com a existência dessa relação. A possível ação das vitaminas antioxidantes no combate a radicais livres permanece desconhecida ou é incerta para a maioria. Esses resultados surpreendem, já que essas questões têm recebido atenção considerável da mídia e a ação antioxidante das vitaminas C e E e do beta-caroteno tem sido destacada na publicidade de produtos vitamínicos. Isto pode ser atribuído ao fato da população do estudo ser majoritariamente jovem e, conseqüentemente, ainda não se preocupar com o risco dessas doenças.

Os estudantes da área de Ciências Biológicas obtiveram, em média, um escore total de crenças menor que os das outras áreas. Esse resultado pode indicar que, comparativamente, eles tendem a ser menos crédulos com relação às vitaminas e produtos vitamínicos do que os estudantes das outras áreas.

Os estudantes que consumiram produtos vitamínicos regularmente tenderam a se diferenciar dos não consumidores quanto às crenças sobre benefícios e riscos associados às vitaminas. Sempre que detectada diferença entre esses grupos quanto ao escore médio de uma proposição, este foi maior entre os consumidores. O mesmo ocorreu com o escore total, indicando que aqueles que consomem produtos vitamínicos tendem a acreditar mais intensamente nos aspectos benéficos atribuídos às vitaminas que os que não os consomem. Dois outros estudos também detectaram diferença estatística entre o escore de crenças de consumidores e não consumidores desses produtos: o de Eldridge e Sheehan (3) entre universitários norte-americanos e o de Worsley *et al.* (4) em amostra da população adulta de Adelaide, Austrália. Em geral, os pesquisadores concluem que essas crenças parecem fundamentar ou pelo menos acompanhar a suplementação da dieta.

Ajzen e Fishbein (13) argumentam que há uma cadeia causal ligando as crenças ao comportamento, intermediada pela atitude e por normas subjetivas. As crenças determinam a atitude e as normas subjetivas (percepção quanto à aprovação ou reprovação social a um comportamento), que podem então determinar a intenção e a ação correspondente. Para Ajzen e Fishbein, pode-se avançar na compreensão de um comportamento seguindo seus determinantes até as crenças a ele subjacentes. Nesse sentido, embora as crenças não necessariamente predigam o comportamento, acreditar nos benefícios ou em conseqüências adversas de determinado comportamento sobre a saúde pode ser considerado um passo preliminar para a ação.

Worsley *et al.* (4) concluem que, entre os consumidores, crenças cientificamente aceitáveis estão misturadas a crenças pseudocientíficas promovidas comercialmente. Eles consideram que o público tem poucos meios de distinguir entre esses dois conjuntos de crenças e que a mídia não contribui para isso, pois raramente discute o mérito científico das informações sobre nutrição que nela circulam. Com relação aos suplementos nutricionais, como destaca Borum (14), é necessário explicitar ao público as condições específicas e as limitações dos estudos nos quais as alegações de efeitos sobre a saúde estão fundamentados para reduzir a confusão e desinformação sobre esses produtos.

Em seu conjunto, os resultados obtidos revelam a extensão das crenças sobre as vitaminas e do consumo de produtos vitamínicos e sugerem que crenças em benefícios cientificamente questionáveis podem estar associadas ao consumo desses produtos. Embora não possibilitem avaliar a adequação da suplementação constatada, os dados apresentados evidenciam a importância de ações relativas à educação nutricional e em saúde e apontam para a necessidade de regulamentar e restringir as alegações de benefícios veiculadas através da publicidade e rotulagem de suplementos nutricionais.

AGRADECIMENTOS

Aos estatísticos da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Andréa Ferreira Semolini e Helymar da Costa Machado, pelo suporte na condução e discussão da análise estatística dos dados da pesquisa de campo.

REFERÊNCIAS

1. Barros JAC. Propaganda de medicamentos – Atentado à saúde? São Paulo: Hucitec/ Sobravime, 1995.
2. Bernier JJ. Pathologies induites par des fortes doses de vitamines. Cah Nutr Diet 1996; 31: 76-80.
3. Eldridge AL, Sheehan ET. Food supplement use and related

- beliefs: survey of community college students. *J Nutr Educ* 1994; 26: 259-265.
4. Worsley A, Crawford DA, Baghurst KI. Diet, food beliefs and dietary supplementation. *Ecol Food Nutr* 1987; 19: 281-296.
 5. Thomas PR. Food for thought about dietary supplements. *Nutr Today* 1996; 31: 46-54.
 6. Foddy W. Constructing questions for interviews and questionnaires: Theory and practice in social research. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
 7. Mueller DJ. Measuring social attitudes. New York: Teachers College, 1986.
 8. Secretaria de Vigilância Sanitária / Ministério da Saúde. Portaria nº 32, de 13.1.98: Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de suplementos vitamínicos e ou de minerais. 1998.
 9. Secretaria de Vigilância Sanitária / Ministério da Saúde. Portaria nº 40, de 13.1.98: Regulamento que estabelece normas para níveis de dosagem diária de vitaminas e minerais em medicamentos. 1998.
 10. Bryman A, Cramer D. Quantitative data analysis for social scientists. New York: Routledge, 1990.
 11. Bode AM. Metabolism of vitamin C in health and disease. *Adv Pharmac* 1997; 38: 21-47.
 12. Thomsen PA, Terry RD, Amos RJ. Adolescents' beliefs about and reasons for using vitamin/mineral supplements. *J Am Diet Assoc* 1987; 87:1063-5.
 13. Ajzen I, Fishbein M. Understanding attitudes and predicting social behavior. New Jersey: Prentice-Hall, 1980.
 14. Borum PR. Supplements: questions to ask to reduce confusion. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (Suppl 2): 538S-40S.

Recibido: 25-10-2001

Aceptado: 10-05-2002

Modelo biológico para la detección de antígenos alimentarios

Norberto Bassan, Miguel Vinuesa, Stella Roma y Fernando Pérez

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.
Rosario, Argentina

RESUMEN. Algunos alimentos contienen macromoléculas potencialmente antigénicas capaces de producir reacciones inflamatorias alérgicas en individuos previamente sensibilizados. Nuestro objetivo es desarrollar un modelo animal para detectar antígenos alimentarios en la dieta a partir de la respuesta de hipersensibilidad. Conejos neozelandeses se dividieron en 5 grupos. Grupo 1 (G1): control. G2: sensibilizado con ovoalbúmina (OVA). G3: no sensibilizado y desafiado oralmente con OVA. G4: sensibilizado con OVA y desafiado con buffer fosfato. G5: sensibilizado y desafiado con OVA. Muestras de ciego se colorearon con sales de plata y Alcian Blue (AB) pH <1. Otras se inmunomarcaron con anticuerpos monoclonales anti CD5 y anti CD25. Niveles de IgE específica se detectaron mediante el test de PCA. Histopatológicamente el G5 mostró edema intenso parcheado, linfangiectasias e infiltrado eosinofílico. Se cuantificaron: mastocitos en G1: 1.33 células/ campo; G2: 12.80 y G5: 10.20. Células enteroendócrinas en epitelio superficial: G1: 1.6; G2: 6.0; G5: 4.2 y en epitelio criptal: G1: 3.0; G2: 12.0 y G5: 7.3. Linfocitos CD5+ en G1: 24.21; G2: 22.12 y G5: 23.97 y CD25+ en G1: 12.10; G2: 14.30 y G5: 21.68. El G3 resultó similar al G1 y el G4 al G2. Los mastocitos aumentaron por la inducción de la respuesta inmune por OVA. Las células enteroendócrinas incrementaron en los sensibilizados debido a una mayor expresión de gránulos citoplasmáticos o diferenciación de stem cells y disminuyeron en los desafiados por degranulación citoplasmática. Los linfocitos T totales no mostraron diferencias significativas; pero sí se elevó el número de linfocitos CD25+ en los sensibilizados y desafiados. Concluimos que el conejo sensibilizado y desafiado oralmente, es un modelo válido para estudiar los antígenos presentes en los alimentos y sus reacciones alérgicas digestivas.

Palabras clave: Alergia alimentaria, modelo en conejos, ciego, inmunohistoquímica.

SUMMARY: Biological model for detection of food antigens.

Antigenic macromolecules present in food can induce inflammatory allergic reaction in sensitized persons. The aim of the present work is the development of an animal model to detect food antigens based on hypersensitivity reaction after food ingestion. New Zealand rabbits were divided in 5 groups. Group 1 (G1): control. G2: Ovalbumin (OVA) sensitized. G3: sensitized and orally challenged with OVA. G4: OVA sensitized and phosphate buffer solution challenged (PBS). G5: sensitized and challenged with OVA. Samples from cecum were stained with Alcian Blue pH <1 for mast cells and with silver method for enteroendocrine cells (EEC). Other samples were immunostained with anti CD5 and CD25 monoclonal antibodies. Specific IgE levels were detected by PCA. Histopathology of G5 showed patchy edema, lymphangiectasia and eosinophilic infiltration. Results were expressed as cells per HPF (high power field); Mast cells in G1: 1.33; G2: 12.80 and G5: 10.20. Enteroendocrine cells in surface epithelium: G1: 1.6; G2: 6.0; G5: 4.2 and in deep epithelium: G1: 3.0; G2: 12.0 and G5: 7.3. Lymphocytes CD5+ in G1: 24.21; G2: 22.12 and G5: 23.97 and CD25+ in G1: 12.10; G2: 14.30 and G5: 21.68. Group 3 were similar to G1 and G4 to G2. We observed: mast cells increased in number probably due to OVA induced response. EEC showed an increase in sensitized animals because of higher expression of cytoplasmic granules or differentiation from stem cells. Decrease in EEC number in challenged groups was likely to be based on vesicles release. Total T cells showed no significant differences among groups. CD 25+ cells were higher in sensitized and challenged animals. We concluded that rabbit model of sensitization and oral challenge is valid to study ingested food antigens and potential digestive pathologic reactions.

Key words; Food allergy, rabbit model, cecum, immunohistochemistry.

INTRODUCCION

La alergia digestiva corresponde a respuestas inmunes anómalas frente a sustancias alérgicas ingresadas por vía oral, en individuos previamente sensibilizados (1,2).

Los alérgenos pueden ser componentes normales de los nutrientes, formar parte de los aditivos o ser sustancias que normalmente no se encuentran en el producto natural, pero sí en variedades transgénicas de los mismos. El modo de preparación puede aumentar o disminuir la capacidad

antigénica de un alimento o modificar estructuras moleculares dando lugar a reacciones cruzadas (3).

Los alimentos capaces de producir alergia alimentaria más estudiados son: leche de vaca, huevo de gallina, trigo, tomate, chocolate, maní, pescados, ostras y mariscos (4).

Se estima que el 0,2 % de la población presenta síntomas de alergia a los alimentos. En USA el 5% de los menores de 3 años y el 1,5% de la población general (alrededor de 4.000.000) manifiesta síntomas de alergia a los alimentos (5).

Entre los factores que favorecen la entrada inapropiada de moléculas por la barrera mucosa del intestino y en consecuencia facilitan la sensibilización a un antígeno alimentario, se cuentan el déficit de IgA secretoria, frecuente en los niños, el alcohol, infecciones virales y bacterianas, drogas anti-inflamatorias, quimio y radioterapia, stress y todo aquello que pueda producir injuria a nivel intestinal (2).

El interés actual por el estudio de la alergia y la intolerancia alimentaria se manifiesta por la preocupación de la Comunidad Médica, la Industria Alimentaria y Organismos de Gobiernos de países como Canadá, USA y UK.

Estos Gobiernos exigen que el etiquetado de los alimentos contenga una lista de los ingredientes de ese producto, haciendo hincapié en aquel componente que podría causar una reacción adversa, a fin de evitar una consumición inadvertida del mismo. Además han desarrollado programas de educación para la industria alimenticia (6).

En 1995 la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas, realizó un listado de los alimentos e ingredientes potencialmente alergénicos. Estos fueron: leche de vaca, huevos, crustáceos, pescado, soja, maní, nueces, sulfitos, trigo, cebada, centeno (7).

Determinar la presencia de componentes con capacidad antigénica directa o cruzada, dentro de un alimento puede resultar complejo. En muchos casos, la industria de los alimentos, utiliza el mismo equipamiento para procesar más de un tipo de producto alimentario. Ejemplo de esto sería pasta con huevo y pasta libre de huevo. Por lo tanto se requeriría una adecuada limpieza del equipamiento utilizado para impedir la persistencia del ingrediente alergénico.

En los alimentos elaborados comerciales es frecuente que las etiquetas no describan todos los componentes o lo hagan con nombres que no son fácilmente reconocibles. Por otra parte las pruebas in vitro no logran reflejar con exactitud lo que sucede en el organismo con los antígenos naturales y los tests cutáneos y los desaffos labiales u orales conllevan un importante grado de riesgo para el paciente (8).

El conejo es un mamífero lagomorfo cuyas características y respuestas biológicas son similares a los primates, permitiendo una extrapolación aceptable de los resultados obtenidos en él. (9).

En la fisiología digestiva del conejo, la cecotrofia es un mecanismo típico con una influencia decisiva, tanto en sus características nutricionales como en los procesos patológicos que se relacionan con la misma, el ciego es el sitio donde se producen importantes transformaciones y representa el órgano central de la cecotrofia.

El volumen relativo del ciego (49% del aparato digestivo), relacionado al de otras especies (16% caballo, 3% vaca, 5,6% cerdo), orienta sobre la importancia de este órgano. Los nutrientes ingeridos por el conejo son sometidos a una

digestión enzimática en el intestino delgado y luego pasan al ciego donde se realiza la digestión bacteriana. Allí macromoléculas en distintas etapas de degradación y potencialmente antigénicas, permanecen en contacto con la mucosa cecal entre dos a doce horas.

Si el producto de la digestión cecal abandona dicho órgano en las primeras horas de la mañana, recibe una envoltura de moco colónico, constituyéndose los cecotrofos. Estos salen por el ano y son ingeridos por el animal reiniciando el ciclo digestivo, que puede repetirse dos o tres veces.

Este mecanismo hace que el ciego se comporte, desde el punto de vista de la digestión, como el rumen de los poligástricos, es decir como una cuba de fermentación.

Si el producto de la digestión cecal sale del ciego en horas de la tarde se elimina como heces que no son reingeridas.

El mecanismo de la cecotrofia hace que lleguen, permanezcan y reciclen en el ciego moléculas en diferentes etapas de degradación y con diversa potencialidad antigénica, permitiendo el contacto de los antígenos con la barrera mucosa. Este hecho resulta favorable para el estudio de la reacción local de hipersensibilidad en el tubo digestivo (10-13).

En el intestino los antígenos alimentarios pueden ser incorporados por los enterocitos (entrada apropiada de moléculas) y contactar con linfocitos Th3 (T helper) gamma-delta intraepiteliales produciéndose una respuesta de tolerancia activa. (14).

Si la entrada de moléculas es inapropiada (barrera mucosa alterada), el antígeno activa linfocitos Th1 y Th2 e inmunocompromete linfocitos B sensibles al antígeno, que pasan al folículo, donde se activan. (15). Éstos drenan a los ganglios linfáticos mesentéricos donde proliferan y maduran, algunos a linfocitos B memoria y la mayoría a plasmoblastos (16). Por vía linfática pasan al torrente sanguíneo; luego a la lámina propia, a folículos de las placas de Peyer del intestino y al tejido linfático de otras mucosas. En estas localizaciones proliferan y se diferencian a plasmocitos sintetizadores de IgE (17,18) que se une a mastocitos y basófilos.

Un nuevo contacto del antígeno a nivel del intestino, con células inmunocompetentes (linfocitos y mastocitos sensibilizados) desencadena una cascada de hechos que conduce a la generación de una reacción inflamatoria aguda anafiláctica local (19,20). Esta reacción presenta modificaciones cualitativas de la mucosa y cuantitativas de células tales como linfocitos, mastocitos y células enteroendócrinas (CEE).

Los mastocitos mucosos, que predominan en intestino y pulmón, son T dependientes. Su proliferación depende de linfoquinas de células T, contienen condroitínsulfato y poca histamina. Sintetizan leucotrienos C4 y B4 y presentan

abundantes receptores de membrana para IgE (21- 24).

Las células enteroendócrinas (CEE) producen hormonas que actúan sobre la motilidad, secreción y absorción de nutrientes. Captan y decarboxilan precursores amínicos y contienen gránulos secretorios detectables con soluciones de plata amoniaca y anticuerpos monoclonales anti-cromogranina (25-28).

Se ha comprobado su participación en la regulación de la respuesta inmune gastrointestinal. Las CEE, mediante la secreción de sustancia P, actúan sobre receptores de membrana NK-1R de los linfocitos T, modulando la respuesta inmune (29,30). También producen una sustancia similar bombesina que atrae eosinófilos (31).

Objetivo

Desarrollar un modelo biológico para la detección de antígenos presentes en los alimentos, basado en el estudio histoinmunopatológico de la reacción anafiláctica local del ciego de conejo, previamente sensibilizado.

MATERIAL Y METODO

Se utilizó como modelo el ciego de conejo. En este animal se reprodujeron las condiciones inmunológicas de individuos que, una vez sensibilizados incorporan por vía oral, el antígeno al cual están sensibilizados y cuya presencia, como componente de un alimento, se investiga.

Se utilizaron conejos neocelandeses adultos jóvenes, en condiciones normales de bioterio, alimentados con balanceado comercial (17% de proteína bruta como máximo y 12% de fibra como mínimo), con alimento y bebida ad libitum.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario.

Se formaron 5 grupos de 20 animales cada uno.

- Grupo 1: control normal.
- Grupo 2: sensibilizado con ovoalbúmina (OVA).
- Grupo 3: no sensibilizado con OVA y desafiado con solución de buffer fosfato (PBS).
- Grupo 4: sensibilizado con OVA y desafiado con PBS.
- Grupo 5: sensibilizado con OVA y desafiado con OVA.

Sensibilización

Los conejos de los grupos 2, 4 y 5 fueron sensibilizados por vía intraperitoneal en dos oportunidades, con 15 días de diferencia entre ambas. Se les aplicó 2 ml de una solución de 70 µg de OVA y 30 mg de ALUM / ml. (19, 32)

Determinación de la sensibilización

Los títulos de IgE específica sérica anti OVA de los conejos sensibilizados se determinaron por el test de

anafilaxia cutánea pasiva (PCA). (32). Ésta se desarrolló en ratas Wistar de 8 semanas. Se les inyectó subcutáneamente, en cuatro lugares distintos de la piel del lomo, 0,05 ml de suero de conejo sensibilizado en diluciones de 1/40; 1/80; 1/160 y 1/320. Como control se administró de la misma forma con suero de conejo no sensibilizado. Después de 48 horas, las ratas fueron inyectadas por vía endovenosa con una solución de 1 mg de OVA en 0,05 ml de PBS con Evan Blue al 1%. Las ratas fueron sacrificadas 10 minutos después de la inyección endovenosa. Se consideró como positivas aquellas diluciones que provocaron máculas azuladas de 5 mm o más de diámetro.

Desafío

Los grupos 3 y 5 fueron desafiados con 15 días de posterioridad a la última sensibilización y con 48 hs de ayuno. El desafío se efectuó mediante la instilación, por sonda intragástrica, de 150 mg de OVA en 20 ml de una solución de PBS (19).

Los conejos del grupo 4 (control de desafío) fueron instilados de igual manera, pero sólo con la solución de PBS.

Los animales se sacrificaron por sobredosis de éter sulfúrico. Los de los grupos desafiados y los controles de desafío, 24 hs después del desafío oral. Los del grupo 1 y 2, 15 días después de la última sensibilización.

Muestras y fijación de tejidos

Del ciego de cada animal se obtuvieron 3 muestras para cada técnica a realizar.

Las muestras para inmunohistoquímica se sumergieron en medio líquido protector para congelación rápida (OCT) y se congelaron en nitrógeno líquido, se almacenaron a -20 grados centígrados y se cortaron a 8 µ con crióstomo, realizándose 5 cortes de cada muestra.

Muestras para histoquímica de mastocitos se fijaron en Carnoy y muestras para histología convencional e histoquímica de CEE en formol neutro al 10%.

El material para histología convencional y para histoquímica se incluyó en parafina y cortó a 6µ, efectuándose 5 cortes de cada muestra para cada técnica.

Anticuerpos monoclonales

- Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron:
- Ratón anti-conejo CD5 (KEN-5, BALB/C IgG 1, Pharmingen, San Diego, California) para la identificación de células T totales maduras (33).
 - Ratón anti-conejo CD25 (KEI-alfa 1, BALB/C IgG 2b, Pharmingen, San Diego, California), marcador de activación (33).

Para la inmunotinción de las células positivas se utilizó Histostain Kit, Zymed, South San Francisco, CA).

Inmunohistoquímica

Los cortes por congelación, fijados en alcohol al 100% se bloquearon con suero no inmune al 2% en solución tampón TRIS salina (TBS) para evitar tinciones inespecíficas y se incubaron durante 60 minutos a 37 grados con los anticuerpos monoclonales mencionados.

Como control positivo se emplearon cortes de timo de conejo y como control negativo se utilizó anticuerpo ratón IgG 1 e IgG 2, laboratorio Zymed, en lugar del primer anticuerpo.

Histoquímica

La detección de mastocitos se realizó en el material fijado en Carnoy. Previo a la coloración, los cortes se sumergieron en una solución de ácido clorhídrico 1 M (HCl 1M) de pH<1, se colorearon con Alcian Blue al 1% en ácido clorhídrico lográndose un pH <1 y se lavaron con la solución precitada antes de su deshidratación y montaje (34).

Las CEE se detectaron sobre material fijado en formol tamponado mediante la técnica de sales de plata de Pascual, que utiliza nitrato de plata acuoso al 0,5%, hiposulfito de sodio al 5% e hidroquinona al 1% en agua destilada (35).

Cuantificación de células

La cuantificación de células positivas CD5 y CD25 se realizó de acuerdo al método descrito por Urau M. y colaboradores (36). Las células positivas fueron analizadas en 20 campos de 400x en cada muestra y expresados como células positivas cada 100 núcleos de enterocitos.

Los mastocitos se contaron en 20 campos de 400x por muestra y se expresaron como la media aritmética por campo microscópico.

En la cuantificación de las CEE se evaluó epitelio superficial y cripta. Se consideraron 20 campos de 400x por cada muestra y las CEE se expresaron en relación a 100 enterocitos.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante prueba de comparación de medias.

RESULTADOS

La positividad del test de PCA en diluciones de 1/160, en los animales sensibilizados intraperitonealmente, indica una respuesta inmune con altos niveles de IgE específica anti OVA.

La prueba de PCA fue negativa en los grupos que no recibieron OVA por vía intraperitoneal.

El desafío por vía oral con OVA produjo cambios en la mucosa del ciego con una reacción inflamatoria local de alergia a los alimentos.

En los animales desafiados por vía oral el estudio histopatológico mostró desestructuración de la histoarquitectura mucosa, intenso edema parcheado con

ensanchamiento de la lámina propia, dilatación de los capilares linfáticos e infiltrado de polimorfonucleares eosinófilos en cúmulos próximos al epitelio. Figuras 1 y 2.

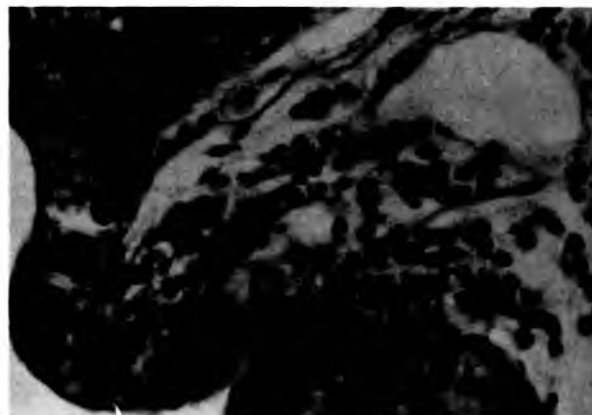
FIGURA 1

Ciego de conejo. Histología normal. HE. 100 x.



FIGURA 2

Animales sensibilizados y desafiados por vía oral con OVA. Edema mucoso y linfangiectasias. HE. 400 x.



Los linfocitos T CD 25+ (linfocitos T activados) aumentaron significativamente en los animales desafiados en relación con los del grupo control y a los sensibilizados. Tabla 1, Figura 3.

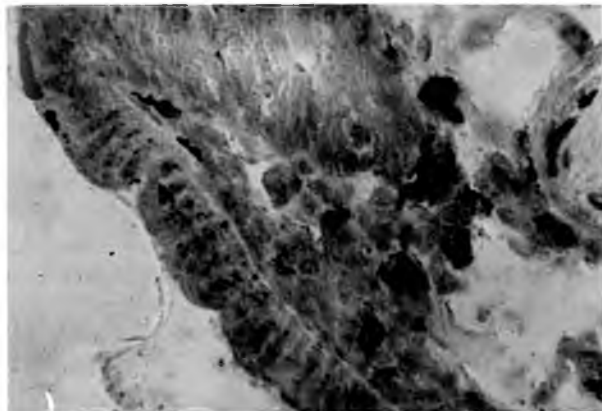
TABLA 1
Células linfáticas positivas. Linfocitos T por 100 enterocitos

Linfocitos T	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 5
CD 5+	24,21	22,12	23,97
CD 25+	12,10*	14,30*	21,68*

* Grupo 5 vs Grupo 1 y 2 p <0.05

FIGURA 3

Linfocitos T CD25 (+): Marcador de activación linfocitaria. Células intraepiteliales ubicadas a nivel del corion. 400 x



Los linfocitos CD 5+ (linfocitos T totales) no se modificaron en los distintos grupos en referencia al control.

Los mastocitos aumentaron significativamente en los sensibilizados localizándose en cercanía de los vasos y del epitelio y descendieron levemente (diferencia no significativa) como consecuencia del desafío. Tabla 2, Figuras 4 y 5.

TABLA 2

Mastocitos mucosos AB +. Media por campo de 400x

Mastocitos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 5
AB+ pH<1	1,33*	12,80*	10,20*

* Grupo 2 y 5 vs Grupo 1 p < 0,05

FIGURA 4

Grupo 1: mastocito mucoso AB (+). Alcian blue pH <1. 400 x.

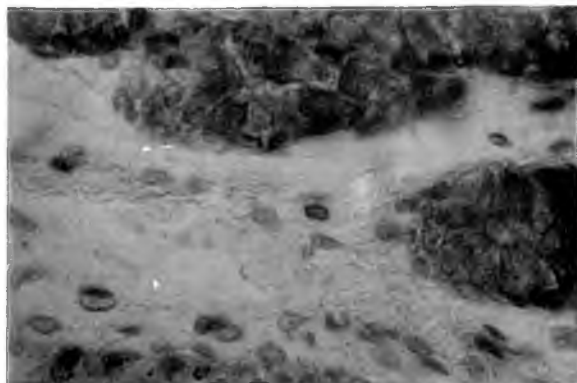
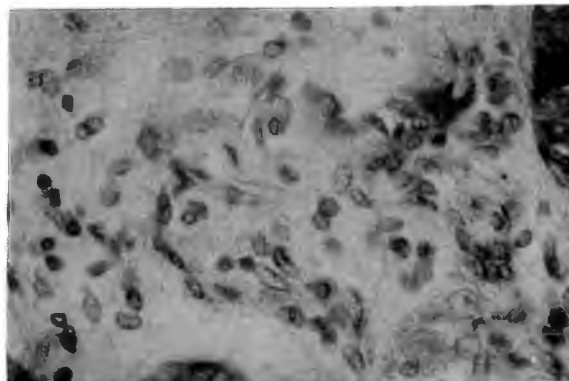


FIGURA 5

Animales sensibilizados y desafiados. Aumento de los mastocitos mucosos AB(+). 400 x.



Las células enteroendócrinas aumentaron significativamente, tanto en el epitelio superficial como en el criptal en los animales sensibilizados en relación al control y decrecieron significativamente en los animales desafiados en comparación con los sensibilizados. Tabla 3, Figuras 6, 7 y 8.

Los resultados obtenidos en los animales del grupo 3 fueron similares a los del grupo 1. Y los del grupo 4 parecidos a los del grupo 2.

TABLA 3

Células enteroendócrinas. Técnica de Pascual. Células positivas por 100 enterocitos

Células enteroendócrinas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 5
Epitelio superficial	1,6	6,0*	4,2*
Epitelio criptal	3,0	12,0**	7,3**

* Grupo 5 vs Grupo 2 p < 0,05 ** Grupo 5 vs Grupo 2 p < 0,05

FIGURA 6

Grupo control: células enteroendócrinas(CEE) en cripta de ciego. Técnica de Pascual. 600 x.

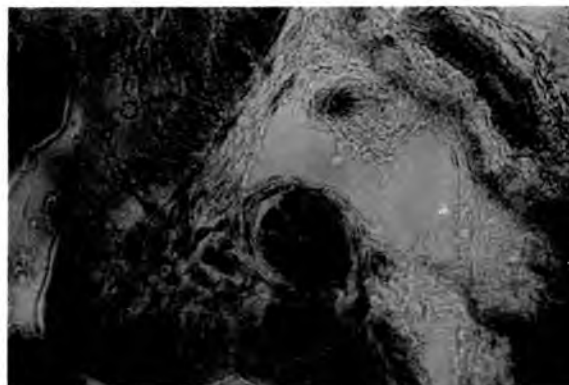


FIGURA 7

Conejos sensibilizados. Aumento de las CEE a nivel de cripta cecal. Técnica de Pascual. 400 x.

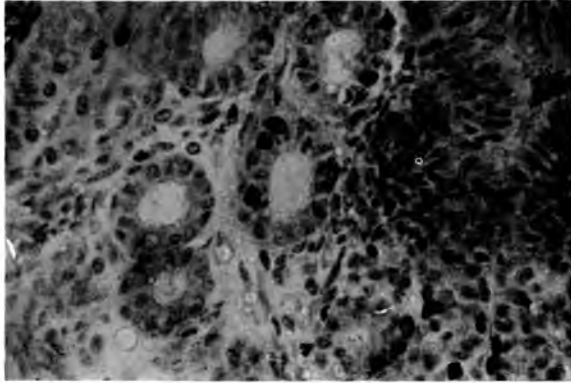


FIGURA 8

Animales desafiados con OVA. Disminución de las CEE. Técnica de Pascual. 250 x



DISCUSION

Últimamente se han desarrollado distintos modelos animales, especialmente en murinos, para el estudio de la respuesta inmune mucosa de hipersensibilidad local en el tubo digestivo.

El modelo propuesto por nosotros utiliza el conejo, que por pertenecer a los mamíferos lagomorfos, poseen como ventaja sobre los modelos murinos, una mayor similitud genética con los primates (9). Esta semejanza, desde la perspectiva mencionada anteriormente, permite una extrapolación de resultados de una especie a otra con menor posibilidad de error.

La particularidad de la fisiología digestiva del conejo, denominada cecotrofia, representa una ventaja adicional en este modelo. El hecho que el ciego se comporte como una

cuba de fermentación, similar al rumen de los poligástricos, hace que los alimentos permanezcan en él un tiempo prolongado. La digestión bacteriana-enzimática de los alimentos realizada en el ciego y la recirculación de los mismos, favorece la penetración de antígenos por la barrera mucosa, con la producción de una reacción de hipersensibilidad local a los alimentos en los animales previamente sensibilizados.

Los altos títulos de la PCA demuestran la capacidad de respuesta inmunológica del conejo y la posibilidad de contar con animales sensibilizados a antígenos específicos. Esto nos permite sensibilizar al animal con distintos antígenos alimentarios purificados que se venden comercialmente o hacerlo con antígenos preparados especialmente.

La respuesta inflamatoria local y las modificaciones en el número de células luego del desafío oral (37), indican que el antígeno es capaz de penetrar por la barrera mucosa. Ingresado el mismo, va a interactuar con los mastocitos que tienen adheridas moléculas de IgE en sus membranas e inducirá la liberación de histamina, serotonina y leucotrienos que producen los cambios histopatológicos descriptos.

En todos los grupos los linfocitos CD 5+ (linfocitos T totales) se detectaron en la mucosa y dentro del epitelio, no modificándose su distribución ni número en relación con la sensibilización y el desafío. Los linfocitos CD 25+ que representan los linfocitos T activados no modificaron su número en los animales sensibilizados en relación al control, pero sí se incrementaron significativamente en los animales sensibilizados y desafiados, indicando su respuesta al contacto con el antígeno incorporado mediante el desafío.

El aumento de los mastocitos en los animales sensibilizados se debería fundamentalmente a la producción de IgE como respuesta a la sensibilización. La IgE actúa sobre el receptor Fc épsilon 1 del mastocito estimulando en forma directa su proliferación. También lo hacen las interleuquinas 3, 4, 9 y 10, la primera en forma directa y las restantes como cofactores para la proliferación mastocitaria.

En los animales sensibilizados y desafiados, la disminución en el número de los mastocitos no alcanza valores significativos, sin embargo podemos considerar su degranulación, y consecuente liberación de factores vasoactivos, traducidos en el edema mucoso y la dilatación vascular linfática

El aumento de las células enteroendócrinas visualizadas en los animales sensibilizados se debería al incremento de gránulos dentro de las células o a diferenciación o replicación de éstas a partir de stem cells. Resultados similares fueron descriptos por Bousbaa et al en bronquios de cobayo (31), por Nogueira y Barbosa en intestino de ratones libres de gérmenes (38) y por Bassan et al en apéndice de conejo (39).

La disminución de las células enteroendócrinas después del desafío se debería a la degranulación de estas células.

Las mismas liberan sustancia P que aumentaría la permeabilidad del epitelio intestinal y actuaría sobre los linfocitos T que expresan en sus membranas el receptor NK-1R y estimularían macrófagos y células presentadoras de antígenos. Además sintetizan una sustancia similar a la bombesina que atrae eosinófilos, productores de histaminasa y arilsulfatasa, de efectos inhibitorios sobre la reacción anafiláctica local.

Las posibilidades de obtener un alto grado de sensibilización específica en el conejo, como el logrado con la albúmina de huevo, permiten explorar mediante el desafío, la presencia de albúmina en alimentos que no declaren dicho componente o en los que éste se encuentre como residuo contaminante.

En forma similar, es posible sensibilizar con antígenos de leche de vaca y analizar las reacciones cruzadas con la leche de cabra o alimentos que la contengan. Utilizando para la sensibilización antígenos de soja podemos investigar su presencia en gran cantidad de alimentos que la contienen y habitualmente no la declaran; o sensibilizando con antígenos de nuez detectar soja transgénica con gen de nuez.

Si bien se dispone de métodos bioquímicos *in-vitro* para el estudio de los componentes antigénicos de los diferentes alimentos, éstos son complejos y de costo elevado, no pudiendo sustituir a los modelos biológicos *in-vivo*, que presentan ventajas en cuanto a la posibilidad de extrapolación al humano (5,6).

CONCLUSION

Lo descripto como parámetros normales y las modificaciones cuali-cuantitativas histoinmunopatológicas, referidas en los animales sensibilizados y desafiados, nos permiten considerar al conejo sensibilizado como un modelo biológico de gran utilidad y confiabilidad para la detección de antígenos alimentarios.

REFERENCIAS

1. Food allergy: Definition, diagnosis, epidemiology, clinical aspects. *Schweiz Med Wochensh* 1996;126 (18):770-776.
2. Gislason S. Immunology Hypersensitivity Diseases –Food Allergy–Delayed Hypersensitivity Immunology and Mechanism. www.nutrained.com/index.html
3. Sabbah A, Drouet M, Luret MG, Giffard G, Minkhar M. Cross reactivity between cow’s milk and goat’s milk. *Allerg Immunol Paris* 1997;29(7):203-214.
4. Ahmed T, Fuchs G. Gastrointestinal Allergy to food: A review. *J Diarrhoeal Dis Res* 1997;15(4): 211-23.
5. Sampson HA. Food allergy. Part I: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 5:717-729.
6. Taylor SL, Hefle SL. Food science perspective on food allergy. *Allergy* 1998; 53(Suppl 46): 5-7.

7. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergys. Rome. Italy, 13-14 November 1995.
8. Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlations between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE and food challenges. *Allergy* 1997; 52(19): 1031-5.
9. Mage RG. Immunology of lagomorphs. 1998. In *Handbook of Vertebrate Immunology*, P Pastoret, P Griebel, H Bazin and A Govaerts, eds. Academic Press, San Diego, pp 223-260.
10. Costa-Batlloiri P, Marzo I. Influencia de la nutrición en la patología cunfcula. XVI Symposium Nacional de Cunicultura. 41-53 Castellón. España. 1991.
11. Fekete S, Bonori J. The effect of the fiber and protein level of the ration upon the cecotrophy of rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1985; 8: 68-71.
12. Hollyster A. G. Effects of water administrated probiotics and acidifiers on growth feed conversion and enteritis mortality of weaning rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1989; 12: 143-147.
13. Fekete S. Recent finding and future perspectives of rabbit’s digestive physiology. *Cuni-Sciences* 1987; 4(3): 1-9.
14. Wiedermann U, Jahn-Schmid B, Bohle B, Repa A, Renz H, Kraft D, Ebner C. Suppression of antigen-specific T and B cell responses by intranasal or oral administration of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, in a murine model of type I allergy. *J All Clin Immunol* 1999; 103 (6): 1202-1210.
15. Ermak T, Baghat H, Pappo J. Lymphocyte compartments in antigen-sampling regions of rabbit mucosa lymphoid organs. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:14-28.
16. Mc Ghee J, Mestecky J, Elson C, Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989; 9:175-199.
17. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson R, Staats H, Fujohashi K, Burrows P, elson C, Pillai S, McGhee R. Helper T cell subsets for IgA response: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in MALT. *J Exp Med* 1993; 178:1308-1320.
18. Mc Kay D, Perdue M. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. *Cells and mediators. (First of two parts). Dig Dis Sciences* 1993; 38:1377-1387.
19. Vinuesa, M. Tanaka. Y. Hakugawa, J. Jae Bac, S. Katayama, I. In-situ epression of interleukin-4, 5 and 6 in Peyer’s Patch from Ovalbumin (OVA)-sensitized BALB/c mice after oral challenge. *International Allergology* 1997;46 (4).
20. Ogra P. Mucosal immunology: Past, present and future. *Vaccinia, Vaccination and Vaccinology: Jenner, Pasteur and their successors*, pp 33-41; 1996.
21. Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, Matsuda H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sciences* 1993; 306(3):185-191.
22. Kitamura Y, Yamamoto S, Galli S, Greaves M. Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function. New York. Raven Press, 1995.
23. Wagelie-Steffen A, Metcalfe D. Molecular mechanisms that regulate mast cell differentiation and survival. *Proceedings of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology*, Cancún, October 19-24, 1997.

24. de Crescenzo G, Marino I, Genovese A, Gleich G. Functional interactions between human mast cells and eosinophils. Proceedings of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Cancún, October 19-24, 1997.
25. Feyrter F. *Über diffuse endokrine epitheliale Organe*. Leipzig: Barth 1938; 6-17.
26. Grimelius L, Wilander E. Silver stains in the study of endocrine cells of gut and pancreas. *Invest Cell Pathol* 1980; 3: 3-12.
27. Titlbach M, Falt K, Falkmer S. Post natal maturation of the islets of Langerhans in sheep. Light microscopic, immunohistochemical, morphometric and ultrastructural investigations with particular reference to the transient appearance of argyrophil insulin immuno-reactive cells. *Diab Res* 1985; 2:5-15.
28. Titlbach M, Falt K, Falkmer S. Ontogeny fo the pancreatic islet parenchymal cells in rabbits. An immunohistochemical and ultrastructural study with particular regard to the earliest appearance of argyrophil insulin, immunoreactive cells. *Diab Res* 1987; 5:105-117.
29. Stead R, Bienenstock J, Stanisz A. Neuropeptide regulation of mucosa immunity. *Immunol Rev* 1987; 100:333-359.
30. Pascual D, Kiyono H, Mc Ghee J. Neuroimmune modulation of lymphocyte function: Substance P enhances immunoglobulin synthesis in LPS activated murine splenic B cells. *Int Immunol* 1991; 3:1223-1229.
31. Bousbaa H, Fleury-Feith, J. Effects of a long-standing challenge on pulmonary neuroendocrine cells of actively sensitized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 714-717.
32. Tomoe, S. Iwamoto. I. Yoshida. S. Tomioka. H. The in vivo depletion of CD4+ T cells prevents antigen-induced eosinophil infiltration into mouse skin. *Jpn J Allergol* 1992; 3:572-578.
33. Kotani M. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rabbit CD4, CD5 and CD11a antigens. *J Imm Meths* 1993; 157: 241-52.
34. Bassan N, Vinuesa M, Pérez F, Roma S, Bernardi S, Lagrutta M. Mastocitos Azul Alciano positivos en la mucosa del ciego de conejos normales y esplenectomizados, sensibilizados y desafiados con ovoalbúmina. *Analecta Veterinaria* 1998; 18: 15-20.
35. Pascual J. APUD cells and neuroepithelial bodies in hamster lung. *Thorax* 1980; 35: 371-4.
36. Urao M, Teitelbaum D, Drongowski R, Coran A. The association of gut-associated lymphoid and bacterial translocation in the newborn rabbit. *J Ped Surgery* 1996; 31: 1482-87.
37. Bassan N, Roma S, Vinuesa M, Pérez F, Bernardi S, Araujo A. Ciego de conejos sensibilizados con ovoalbúmina y desafiados por vía oral: histoinmunopatología. *Patología. Revista Latinoamericana* 1999; 37:87-92.
38. Nogueira A, Barbosa S. Immunohistochemical study of intestinal endocrine cells in germ-free mice. *Eur J Histochem* 1994; 38: 213-218.
39. Bassan N, Vinuesa M, Pérez F, Roma S, Bernardi S. Células enteroendócrinas intraepiteliales en ciego y apéndice de conejos sensibilizados con ovoalbúmina. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1999; 29 (5): 313-317.

Recibido: 16-11-2000

Aceptado:26-04-2002

¿Qué es envejecer? *

José María Bengoa

Fundación Bengoa. Caracas, Venezuela

¿Qué es envejecer?

Envejecer es vivir. Comenzamos a envejecer desde el mismo momento de nacer. Unas células mueren antes que otras, y la vida es un continuo nacer y morir. Es raro morir por ser viejo; de hecho durante la vida se van acumulando agresiones externas que causan enfermedades, y al final, de una de ellas se muere.

Como decía ya hace muchos años Virchow. "No todos los tejidos del cuerpo nacen al mismo instante ni mueren todos al mismo tiempo; se encuentran tejidos juveniles en la extrema vejez y tejidos ya en senescencia en el feto".

Se podría decir que el envejecimiento debe verse como un proceso inevitable de involución que puede conllevarse con un buen grado de serenidad y conformidad.

El hombre necesita 20 años para crecer y vive cinco veces 20 años, es decir 100. El camello crece durante ocho años y vive el quíntuple de ocho, es decir 40 años. El caballo crece durante cinco años y vive el quíntuplo de cinco, es decir 25 años. Esta ley sólo se aplica a los mamíferos.

En los Estados Unidos de América el porcentaje de niños de 0 a 9 años y el de ancianos de 70 a 79 años es el mismo: un 9%. En el año 2020 habrá países con más de 20% de personas mayores de 60 años. Las consecuencias de estos hechos serán de tal magnitud que es muy posible que muchas de las conquistas logradas con el Estado de bienestar se verán muy comprometidas. También los parques y viviendas sufrirán modificaciones.

¿Es decir ¿Toda la vida es un proceso de envejecimiento?

Sí. Teóricamente toda la vida es un proceso de envejecimiento, pero obviamente existen etapas en la vida del hombre que se diferencian mucho entre sí. Durante los primeros 20 años aproximadamente el crecimiento y

desarrollo, domina la escena; más tarde el período entre los 20 y 60 años corresponde al proceso reproductivo y a partir de entonces comienza la involución, que por cierto en el ser humano, es un proceso largo. Casi todos los animales mueren después del período reproductivo, menos el hombre que prolonga su vida muchos más años. No sabemos por que.

¿Se han logrado avances en el conocimiento del proceso senil?

Los avances han sido extraordinarios en el control de enfermedades cardiovasculares y en grado menor, pero también significativa. En el control del cáncer y los trastornos mentales. La calidad de vida de los ancianos es hoy mucho mejor que hace 30 ó 40 años.

También se conoce mejor el proceso senil, ya que años atrás se concebía el deterioro físico y mental como un proceso inevitable y progresivo. Hoy sabemos que muchos signos de deterioro en los ancianos se pueden evitar y con frecuencia hacerlas reversibles. Tal es el caso de la pérdida de masa magra (músculos) que puede ser frenada y hasta recuperar las pérdidas.

Muchos ancianos mantienen una vida activa de trabajo después de los 65 años. En América Latina el trabajo agrícola sigue siendo dominante en los ancianos. En Argentina el 15,7% de la población mayor de 65 años trabaja, en Costa Rica el 30,5% y en México el 54,4%.

Hoy sabemos cuántos ancianos hay en cada país, sabemos también de qué mueren, pero paradójicamente no sabemos dónde viven, qué comen, cuantos viven solos, si alguien atiende sus quejas, si disponen de algún recurso económico, si añoran por algún familiar, es decir, se puede afirmar que en una gran parte de países los ancianos constituyen el grupo humano más abandonado por las autoridades y la sociedad entera. La solidaridad social no se mueve al mismo ritmo que los avances científicos.

¿A qué edad se muere por el proceso de envejecimiento?

En realidad es raro morirse por ser anciano. Por lo general se muere por una enfermedad: infarto de las coronarias, embolias cerebrales, diabetes, cáncer, etc. De estas enfermedades se puede morir a cualquier edad, pero durante la

* Con la debida autorización del autor y permiso del Editor de "Anales Venezolanos de Nutrición", donde fue publicado originalmente, "Archivos Latinoamericanos de Nutrición" se complace en reproducir en éste número el interesante artículo ¿Qué es envejecer?. De su lectura hemos disfrutado de la prosa ágil y del fino sentido del humor del Profesor Bengoa, esperamos que usted lector comparta también esta experiencia. J.F.Ch.

vejez el riesgo es mucho mayor, no porque el anciano sea más susceptible a la enfermedad, sino porque a través de los años se han acumulado las agresiones externas: mala alimentación, cigarrillos, alcohol, infecciones, sedentarismo, otros factores desconocidos que causan el cáncer, etc. Los ancianos han estado más tiempo sujetos a las vicisitudes del entorno.

Se puede decir, pues, que el envejecimiento es un deterioro progresivo y generalizado que se traduce en una probabilidad de muerte cada vez mayor por una enfermedad intercurrente.

En cierto modo se podría decir que, salvo en edades muy avanzadas se muere por lo general en la vejez, pero no directamente por la vejez.

¿Qué cambios externos se observan en la vejez?

Ya en plena juventud pueden aparecer signos de envejecimiento: las patillas plateadas, las arrugas amenazantes, la disminución de la velocidad al correr, el abdomen prominente, etc. Son signos de que los años están cayendo sobre la vida. Pero son simplemente signos, y por supuesto nadie se muere por ello.

En cuanto al peso corporal, los cambios que se producen obedecen a una pérdida de masa celular que puede llegar hasta 30% en el curso del proceso de envejecimiento, comprometido principalmente el tejido muscular esquelético. Sin embargo, tanto en el hombre como en la mujer en edades medias, hay una tendencia positiva al incremento del peso que se estabiliza alrededor de los 65 años, después de los cuales el peso tiende a disminuir. El aumento de peso, en las mujeres, es generalmente mayor que en los hombres y en ellas, se estabiliza 10 años más tarde. La reducción de peso después de los 65 años.

Otros estudios indican que el sobrepeso moderado en el adulto mayor está asociado con una baja mortalidad y que por el contrario, en el grupo de ancianos mayores de 80 años, el adelgazamiento y la pérdida de masa magra constituyen un problema más importante que el sobrepeso. En general, se considera que tanto la pérdida como la ganancia de peso son el mejor productor de mortalidad en este grupo.

La grasa corporal (como porcentaje del peso) se incrementa alrededor de 20 al 30% en los hombres y de 27% a 40% en las mujeres y la masa magra declina de los 60 a 50 kg. en los hombres y desde los 40 a los 35 kg. en las mujeres. Gran parte de la pérdida muscular en el envejecimiento es prevenible e incluso puede ser reversible.

Durante el envejecimiento hay, además, una pérdida de la talla y de la masa esquelética. La estatura se reduce alrededor de 3cm. en el hombre y 4cm. en la mujer, lo que obedece principalmente a una disminución de la altura de los discos intervertebrales, a una pérdida del tono muscular y a otros cambios que se producen en la columna vertebral.

¿Todos envejecemos al mismo ritmo?

No, cada uno tiene su ritmo de envejecimiento,

dependiendo de varios factores. Se estima que la herencia familiar o genética puede incidir en un tercio del problema; algo más de otro tercio o más se debería al estilo de vida que la persona ha tenido y algo menos de otro tercio, se debería al azar. Pero, debemos fijarnos que casi en el 40% del proceso de envejecimiento está por tanto programado apenas el 1/3 del proceso.

¿Porqué hay más ancianas que ancianos?

Es un fenómeno universal. La mujer vive varios años más que el hombre, a pesar de que la mujer corre mucho riesgo biológico. El hombre, sin embargo, pasa por mayores peligros ambientales y se expone a más riesgos que la mujer, por sus hábitos de vida (accidentes en el trabajo, alcohol, tabaco, etc.).

Pero todo eso no explica completamente la significativa diferencia entre la esperanza de vida de la mujer y el hombre.

En Europa occidental, América del Norte y Australia, la diferencia en la longevidad, según el sexo, es de 6 a 8 años; en América Latina, de 3 a 5 años. En la India no parecen existir diferencias. También en muchos animales se observan tales diferencias.

Los autores que han estudiado el tema sugieren que la diferencia es genética (en función de los cromosomas que distinguen los sexos (XX en la mujer y Y en el hombre)?

No parece ser cierto que los hombres y mujeres que no han tenido hijos viven más que los que han tenido.

¿El hombre vive más que los animales?

Hay animales, como la tortuga gigante que puede vivir 150 años; el elefante, 80 años; el perro 20 y el gato 28. Una gaviota puede vivir más de 40 años. El hombre, teóricamente es un animal de 100 años aunque pocos pueden llegar a vivir tanto tiempo. El récord parece que tiene una francesa: la señora Jeanne Louise Calmet de vivió 122 años y 5 meses (1875-1997).

¿Es triste tener que envejecer?

No, nada de triste. Es la grandeza y el drama del ser humano que es la única especie animal que sobrevive muchos años después de haber cumplido la etapa reproductiva. Eso pasa por que el ser humano seguramente, además de reproducirse, necesita transmitir a las generaciones jóvenes su experiencia y mensaje de esperanza. Por eso es tan importante conservar la palabra, signo vital de nuestra condición humana.

¿Es verdad que cada vez son más frecuentes los casos de rotura de la cadera (el cuello del fémur), en los ancianos?

Es lógico que así sea, ya que cada vez hay más gente en edades avanzadas. Ello se debe a que en los ancianos hay una pérdida de la masa ósea, principalmente por el descenso

en la actividad física. En E.E.U.U. un tercio de las mujeres mayores de 65 años tienen problemas en las vértebras debido a la osteoporosis (fragilidad de los huesos) y a los 90 años, una de cada tres mujeres y uno de cada seis hombres habrá tenido una fractura de cadera. En Venezuela las cifras parecen ser menores.

Si se mantiene un adecuado consumo de calcio desde edades tempranas de la vida (leche, yoghurt, queso, etc.) junto a ejercicios físicos disciplinados, las probabilidades de contraer la osteoporosis son mucho menores.

¿Por qué son tan frecuentes las caídas en las personas mayores?

Las caídas son una de los dramas de los ancianos. Cualquier pequeño tropezón que en un joven se resuelve con un ligero salto, en un anciano es un grave riesgo de caerse y no poderse levantar, a veces con una fractura de cadera. En edades avanzadas pasear acompañado puede ser recomendable. No hay que olvidar que el reumatismo crónico y la artritis, tan frecuentes en los ancianos, contribuyen también a perder flexibilidad en los movimientos. El bastón, con frecuencia, puede ser también una buena compañía. Lograr mantener a toda costa una movilidad corporal, sean paseos o suaves caminatas, es un consejo de sabios. Una buena motivación es necesaria para mantener una vida activa.

¿Pierde memoria el anciano?

Si, es una queja muy frecuente. Se recuerdan bien épocas pasadas, que por lo general se quedan muy grabadas porque los recuerdos van dejando huellas en la memoria. El anciano repite mucho sus historias pasadas, (los nietos se ríen) sus viajes, sus aventuras, y todo ello, cada vez que se cuenta deja una huella. En cambio, la memoria de cosas inmediatas se va deteriorando con el tiempo.

En cierto modo hay cosas que conviene olvidar. "Sería horrible recordar todos los detalles de nuestra vida", dice un autor. Y agregar "olvidamos porque debemos hacerlo y no porque queremos hacerlo".

¿Por qué está aumentando la enfermedad de Alzheimer?

De hecho, lo que ha aumentado es la esperanza de vida. A los 65 años de edad 1 de cada 100 padece algún tipo de demencia; a los 85 años la proporción es 1 cada 6, y entre estas demencias la de Alzheimer es la principal. En todo caso es un drama familiar al que se le está prestando mucha atención.

Hace años los ancianos padecían de demencia senil, y al tema no se le prestaba mucha atención porque se consideraba un proceso natural de la vejez. Cuando se logra identificar como enfermedad específica surge la esperanza de su curación. Y ya no es un proceso fatal sin esperanza.

¿Es frecuente la ceguera en el anciano?

No, la ceguera total no es frecuente. Lo que sí aqueja al anciano son problemas de cataratas, el glaucoma (aumento de la presión del globo ocular) y las lesiones degenerativas de la mácula (zona central de la retina); las dos primeras curables y de peor pronóstico la tercera.

En todo caso es uno de los órganos del cuerpo humano que requiere revisión frecuente por el médico especialista.

La *diabetes* es una de las causas de ceguera o dificultad de la visión en el anciano. Entre 16 y 18% pueden padecer diabetes a los 65 años de edad. La mitad de los enfermos no saben que padece de diabetes. La enfermedad puede presentarse insidiosa, sin que el enfermo aprecie ningún signo alarmante. El examen de sangre que deben hacerse los ancianos periódicamente es el mejor método de descubrir la enfermedad.

La importancia de la diabetes en los ancianos está en la gran cantidad de complicaciones que puede acarrear.

El control del azúcar en la sangre, el control del peso, el examen médico periódico y una dieta adecuada, son medidas aconsejables.

¿Por qué ahora el cáncer es tan frecuente?

Sencillamente porque vivimos más. Hasta los 90 años la frecuencia del cáncer va aumentando, pero a partir de esa edad la frecuencia se estabiliza, e incluso, tiende a disminuir.

Muchos de los cánceres, como los de pulmón, de colon, de mama y de próstata son más frecuentes en personas de edad avanzada. La mortalidad por cáncer aumenta con la edad hasta los 90 años. Después se estabiliza. La explicación que dan los investigadores es que el cáncer es una enfermedad agresiva y gran consumidora de energía. No todos los cánceres tienen relación con la edad. Las leucemias pueden aparecer a cualquier edad.

Aunque existen diferencias en la frecuencia de ciertos cánceres según la alimentación y el estilo de vida (tabaco, etc.), y por otro lado existen también factores de carácter familiar, no cabe duda que el azar es todavía la dueña del cáncer.

Hoy conocemos mucho más que hace 50 años acerca del cáncer y las investigaciones se multiplican en todos los países. Los avances en el tratamiento son considerables, pero todavía desconocemos su entraña íntima.

¿Por lo general ¿el anciano se muere principalmente del corazón?

Así es, el corazón es muy sensible a los efectos de los años. En E.E.U.U., por ejemplo, las enfermedades cardíacas causan la muerte de una de cada 40 personas a edades comprendidas entre 65 y 69 años; uno de cada 27 entre 70 y 74 años; una de cada 17 entre los 75 y 79 años, una de cada 11 entre los 80 y 84 años y una de cada siete en los ancianos de más de 85 años.

El endurecimiento de las paredes de las arterias principales da lugar a un aumento progresivo de la presión sanguínea lo cual obliga al corazón a trabajar más. Esta compensación tiene un costo. En cada latido el corazón debe esforzarse más y utilizar más energía.

Por eso el cuidado de los niveles de colesterol y otras grasas de la sangre es tan importante. Una alimentación saludable, pobre en grasa de origen animal, es, junto al ejercicio físico, medidas aconsejables.

La aterosclerosis se inicia sorprendentemente pronto y se desarrolla al cabo de los años. La arteriosclerosis consiste en la formación de lesiones en las paredes de la arteria que se convierten en focos de formación de coágulos. En cualquier momento se puede desprender un coágulo y obstruir la circulación de la sangre de una arteria más o menos importante. Así se producen los infartos del corazón, causa de muerte tan frecuente en los ancianos.

También fallas en las vías respiratorias son causa de muchos problemas en los ancianos. El cuidado de las infecciones del aparato respiratorio es esencial. Hoy gracias a las vacunas y a los antibióticos, los problemas son menores, pero todavía la neumonía y el enfisema pulmonar son causa de muerte en muchos ancianos.

¿Le gusta comer bien al anciano?

Por supuesto. Hay ancianos con un apetito envidiable y muy selectivos en las comidas. Sin embargo son frecuentes los problemas del aparato digestivo. Puede haber una pérdida de la capacidad de producir el ácido gástrico, indispensable para la digestión. Puede haber dificultad de absorción de la vitamina B₁₂, por ejemplo.

También con la edad disminuye la secreción salival, la cual disminuye la capacidad de masticar y deglutir los alimentos. También puede haber alteraciones en el intestino (divertículos) que causan molestias.

Por todo ello, es importante atender estos problemas en la elaboración de la comida, que por lo general no se diferencia mucho de la que la familia consume regularmente.

¿Todos los ancianos se parecen entre sí?

Todo lo contrario. A medida que avanza la edad las diferencias se hacen cada vez mayores entre los ancianos. Las personas de 30 años son más parecidas entre sí que las personas de 70 a 80 años. El estilo de vida y sobre todo el tipo de alimentación hace la diferencia entre los ancianos en tres grupos: el tipo de *viejo sacerdote*, flaco, arrugado e irónico; el tipo de *viejo tabernero*, pletórico, bonachón, y bromista y el tipo de *viejo general*, de cejas pobladas y elevadas, andarín, mandón y un tanto quisquilloso.

Seguramente que también entre las ancianas podría diferenciarse varios grupos.

¿Son los ancianos muy susceptibles a las infecciones?

En muchos ancianos es frecuente la desnutrición, lo cual crea un mayor riesgo de contraer infecciones. Las defensas están disminuidas y la capacidad de resistencia es menor a medida que avanza la edad. Las gripes, la tuberculosis, la neumonía y la bronconeumonía, son, con frecuencia, causas de muerte en el anciano. Los cuidados en el anciano en caso de una enfermedad infecciosa, son necesariamente mayores que en el adulto joven. La vacuna antigripal en los ancianos es obligatoria en muchos países. La tolerancia al frío está disminuida en los ancianos.

¿Los ancianos del mañana vivirán mejor que los de hoy?

Sí, sin duda, si atendemos y cumplimos los siguientes consejos:

1. Alimentación adecuada, rica en vegetales y frutas. Nada de tabaco y alcohol con moderación
2. Ejercicio físico moderado, pero disciplinado.
3. Control médico periódico y control de peso.
4. Ignorar la propaganda de productos mágicos.
5. Mantener un grado adecuado de socialización, es decir, de comunicación con los familiares y amigos. Huir de la soledad.
6. Tomar medidas de previsión durante la juventud, que garanticen una cierta seguridad económica en la vejez.
7. A partir de la jubilación, buscar algún quehacer y si fuera posible ofrecerse a un voluntariado social. Huir de una vejez pasiva.
8. Aceptar el envejecimiento como un hecho normal de nuestra vida.
9. Esperar la muerte en paz, preferiblemente en casa, junto a la familia.

REFERENCIAS

1. Nutrición y envejecimiento. Fundación Cavendes y Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela, 1998.
2. Age and aging. J Brit. Geriatric Society, July 1990.
3. Kirkwood. T. El fin del envejecimiento. Fundación "La Caixa". Barcelona, 2000.
4. Bengoa J.M. Metas nutricionales y guías de alimentación para América Latina. UNU y Fundación Cavendes, Caracas, 1998.
5. OMS y OPS. El adulto mayor en América Latina, México. Centro Interamericano de Seguridad Social, México. 1995.
6. Horwitz A. Guías alimentarias y metas nutricionales en el envejecimiento. En: Metas nutricionales y guías de alimentación para América Latina. UNU y Fundación Cavendes, Caracas, 1988.

Perfil de lípidos y lipoproteínas en inmigrantes chinos residentes en Costa Rica

Ileana Holst, Rafael Monge-Rojas, Rita Ma. Marín, Karol Hidalgo, Mónica Kelly

Universidad de Costa Rica, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Inciensa).
Costa Rica

RESUMEN. Se estudió el perfil de lípidos y el patrón de consumo de una población de 50 adultos chinos inmigrantes residentes en San José, Costa Rica durante el año de 1999. Los resultados indican que el 35% de éstos(as) inmigrantes presenta niveles altos de CT ($\geq 5,16$ mmol/L) y el 51% concentraciones elevadas de LDL-C ($\geq 2,84$ mmol/L). Asimismo, en el 36% de la muestra se evidenciaron niveles elevados de Tg ($> 1,69$ mmol/L) y solamente en el 15% concentraciones bajas de HDL-C ($\leq 0,90$ mmol/L). La proporción de hombres con concentraciones elevadas de CT, LDL-C y Tg y niveles bajos de HDL-C fue mayor que la de mujeres; aunque esta diferencia no llegó a ser significativa. El 41% de la población estudiada presentó valores mayores de 4,5 para el Índice de Castelli (CT/HDL-C). En general, cerca del 80% de los (as) chinos (as) inmigrantes consumen vegetales 5-6 veces/semana y alrededor del 50% consumen frutas con esa misma frecuencia. Un alto porcentaje de los inmigrantes consumen alimentos fuente de proteína animal más de 3 veces/semana y alrededor del 23% consumen frecuentemente comidas rápidas y snacks. Nuestros datos sugieren que los inmigrantes chinos mantienen algunas características de su cultura alimentaria. Sin embargo, han modificado su patrón alimentario convirtiéndolo en uno más aterogénico. Es importante que los nutricionistas y otros profesionales del área de la salud, evalúen con mayor detalle los factores asociados al cambio del patrón alimentario en inmigrantes, con el propósito de evitar un aumento en las tasas de morbi-mortalidad por enfermedad coronaria en ese grupo de población.

Palabras clave: Chinos, inmigrantes, colesterol, lípidos, lipoproteínas, patrón alimentario, Costa Rica.

SUMMARY: Lipid profile of Chinese immigrants living in Costa Rica. The lipid profile and food pattern of 50 Chinese immigrants living in San José, Costa Rica were studied during 1999. The results showed that 35% of the immigrants had high levels of total cholesterol ($\geq 5,16$ mmol/L) and 51% had high concentrations of LDL-Cholesterol ($\geq 2,84$ mmol/L). Moreover, 36% of them had high levels of triglycerides ($> 1,69$ mmol/L) and only the 15% had low concentrations of HDL-cholesterol ($\leq 0,90$ mmol/L). The ratio of men with high levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides and low levels of HDL-cholesterol was larger than the one in women; although this difference was not significant. 41% of the studied population presented Castelli's Indexes (TC/HDL-C) above 4.5. In general, around 80% of the Chinese immigrants consume vegetables 5-6 times/week and 50% consume fruits with the same frequency. A high percentage of the immigrants eat food with animal protein more than 3 times/week and around 23% eat frequently snacks and fast foods. Our data suggest that the Chinese immigrants still keep some characteristics of their nutritional culture. Nevertheless, they have changed their food pattern to a more atherogenic one. It's important that nutritionists and other health professionals evaluate in detail the factors associated with the change in the food pattern of the immigrants, in order to avoid an increase in the rates of morbi-mortality of coronary disease in this group of population.

Key words: Chinese, immigrants, cholesterol, lipid, lipoproteins, Costa Rica, food pattern.

INTRODUCCION

La prevalencia de enfermedad coronaria en China es una de las más bajas del mundo, según lo ha demostrado el proyecto MONICA de la Organización Mundial de la Salud (1,2). Las características de su dieta han contribuido con este fenómeno. El consumo de grasa en China es menos del 50% de lo reportado en los Estados Unidos, mientras que el consumo de fibra es tres veces mayor. Asimismo, el consumo de proteína de origen animal es de tan sólo un 10% del consumo reportado en los Estados Unidos (3).

La tasa de mortalidad por enfermedad coronaria es respectivamente 16,7 y 5,6 veces mayor en los hombres y

mujeres estadounidenses comparado con sus contrapartes de China (4). Sin embargo, los chinos que han inmigrando a los Estados Unidos han modificado su estilo de vida y cultura alimentaria incorporando una serie de factores aterogénicos a la misma (5-7). Esto se ha manifestado como un cambio en su perfil de morbi-mortalidad, pues la occidentalización de la dieta esta fuertemente asociada con una mayor susceptibilidad a los efectos pro-aterogénicos y a un incremento en la frecuencia de la enfermedad coronaria en individuos asiáticos (8).

Recientemente se ha publicado que no existen diferencias importantes en los niveles de colesterol entre los asiáticos inmigrantes y aquellos nacidos en los Estados Unidos (5).

Además, se ha informado que la incidencia de infarto al miocardio ha incrementado de forma importante entre los asiáticos que inmigraron a este país (9-11).

La enfermedad cardiovascular en Costa Rica tiene una prevalencia tan elevada como la reportada en Estados Unidos y Canadá (12). Por tanto, los chinos que han inmigrado al país están expuestos a la dieta aterogénica característica de los costarricenses (13) y por ende a un mayor riesgo de desarrollar alteraciones en su perfil lipídico.

El objetivo de este estudio fue analizar el perfil de lípidos y lipoproteínas como indicador de riesgo coronario en chinos inmigrantes a Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Para lograr la participación de los inmigrantes chinos en el estudio, se recurrió a la Asociación China de Costa Rica para lograr la motivación de los mismos. Se reclutaron en total 120 chinos adultos. Sin embargo, solamente 70 cumplieron con el requisito de inclusión en el estudio el cual fue tener ascendencia china de primera y segunda generación.

La firma de cada participante en el consentimiento informado fue requerida para su inclusión en el estudio tal y como lo establecen el Comité Ético Científico del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) y de la Universidad de Costa Rica (UCR).

La prevalencia de sobrepeso se determinó utilizando el Índice de Masa Corporal (IMC).

Para esto los participantes fueron pesados y medidos siguiendo los lineamientos definidos en Lohman et al. (14). La talla fue medida al 0,1 cm más cercano y el peso al 0,1 kg más próximo. Dos mediciones fueron independientemente obtenidas para peso y talla. El promedio de ambas lecturas fue utilizado para el análisis de los datos. El punto de corte utilizado para determinar sobrepeso fue 23 kg/m², de acuerdo a lo recomendado para la prevención de la enfermedad coronaria en asiáticos (15).

El perfil de lípidos se determinó a partir de una muestra de sangre extraída por venipuntura después de 12-14 horas de ayuno utilizando tubos vacutainer (Becton, Dickinson & Co). El suero fue obtenido por centrifugación a 6000 rpm/5 min a 25°C. El HDL-Colesterol (HDL-C) fue separado utilizando ácido fosfotúngstico/Mg⁺⁺ (Wiener Lab, Argentina) como reactivo precipitante y centrifugado a 2000 rpm/15 min. La reacción colorimétrica fue determinada en un espectrofotómetro Shimadzu UV1201 a 505nm y 25°C. El Colesterol Total (CT) y los Triglicéridos (Tg) fueron determinados por métodos enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). El LDL-Colesterol (LDL-C) se calculó utilizando la ecuación de Friedewald et al. (16) Se utilizaron sueros control "normal" y "alto" (DMA Arlington TX) de origen humano para el control de calidad. En aquellos casos donde

las muestras excedían ± 2 DS el valor promedio del control, se realizaron nuevamente las determinaciones. Las concentraciones de CT, LDL-C, HDL-C y Tg fueron clasificadas de acuerdo a los puntos de corte recomendados para la prevención de la enfermedad coronaria en asiáticos (17). CT deseable: < 4,39 mmol/L, CT límite: 4,39-5,15 mmol/L y CT elevado: $\geq 5,16$ mmol/L. LDL-C deseable: < 2,33 mmol/L, LDL-C límite: 2,33-2,83 mmol/L y LDL-C elevado: $\geq 2,84$ mmol/L. HDL-C deseable: >0,90 mmol/L y Tg deseable: < 1,69 mmol/L. Se calculó el Índice de Castelli utilizando la fórmula: CT/HDL-C. Valores mayores de 4,5 se consideraron de riesgo coronario.

El patrón de alimentación se evaluó utilizando una frecuencia de consumo de alimentos autoadministrada. El formulario contempló 50 alimentos incluidos en once grupos de alimentos (3-11 alimentos/grupo). El instrumento fue validado previamente en población similar a la del estudio.

Los datos fueron analizados en el programa SPSS para Windows utilizando las pruebas t-student para comparar los promedios de las variables continuas y Chi-cuadrado para las variables categóricas. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

En total se incluyeron en el estudio 50 adultos chinos, 40% hombres y 60% mujeres con edades entre 30 y 70 años. La edad promedio fue $42 \pm 3,5$ años, sin diferencia entre sexos. El IMC promedio fue $24,2 \pm 3,8$ kg/m². El 65% de los hombres (n=13) y el 47% de la mujeres (n=14) presentaron sobrepeso (IMC >23) (Tabla 1).

Los niveles promedio de CT, LDL-C y HDL-C fueron $4,68 \pm 1,0$ mmol/L; $2,84 \pm 0,9$ mmol/L y $1,16 \pm 0,3$ mmol/L respectivamente. La concentración media de Tg fue $1,44 \pm 0,8$ mmol/L. No se observaron diferencias significativas entre los valores promedio de los lípidos al analizar los datos por sexo (Tabla 1).

En la Tabla 2 se presenta la distribución de chinos (as) inmigrantes según los puntos de corte para lípidos establecidos para la prevención de la enfermedad coronaria en asiáticos. Solamente el 40% de los chinos (as) inmigrantes presentó concentraciones deseables de CT (< 4,39 mmol/L) y cerca del 25% niveles deseables de LDL-C (< 2,33 mmol/L). El 35% de los (as) inmigrantes presentó niveles altos de CT ($\geq 5,16$ mmol/L) y el 51% concentraciones elevadas de LDL-C ($\geq 2,84$ mmol/L). En el 36% de la muestra se evidenciaron niveles elevados de Tg ($\geq 1,69$ mmol/L) y solamente en el 15% concentraciones bajas de HDL-C ($\leq 0,90$ mmol/L). La proporción de hombres con concentraciones elevadas de CT, LDL-C y Tg y niveles bajos de HDL-C fue mayor que la de mujeres; no obstante la diferencia no llegó a ser significativa.

TABLA 1
Características antropométricas y bioquímicas de la población de inmigrantes chinos estudiada

Variable	Total ^a (n=50)	Hombres ^a (n=20)	Mujeres ^a (n=30)	Valor de p*
Edad (años)	42 ± 3.5	41 ± 2.8	43 ± 3.1	0.1723
Peso (kg)	64 ± 11.2	71 ± 14.8	58 ± 8.3	0.0002
Talla (m)	1.61 ± 0.05	1.68 ± 0.07	1.55 ± 0.06	0.0000
Índice de Masa Corporal (IMC);kg/m ²	24.2 ± 3.8	24.5 ± 4.6	23.9 ± 3.1	0.5534
Prevalencia de sobrepeso (%)	56	65	47	0.0342
Colesterol Total (CT), mmol/L	4,68 ± 1,0	4,94 ± 0,9	4,50 ± 1,0	0.1236
Colesterol LDL (LDL-C), mmol/L	2,84 ± 0,9	3,10 ± 0,8	2,69 ± 0,9	0.1045
Colesterol HDL (HDL-C), mmol/L	1,16 ± 0,3	1,08 ± 0,2	1,21 ± 0,3	0.1230
Índice de Castelli (CT/HDL-C)	4.3 ± 1.2	4.8 ± 1.5	3.9 ± 1.2	0.0180
Triglicéridos (Tg), mmol/L	1,44 ± 0,8	1,66 ± 0,9	1,32 ± 0,6	0.1376

a. Los valores se expresan como promedios ± desviación standard. * probado con análisis de t-Student, p>0.05=no significativo. Para convertir mmol/L de colesterol a mg/dL multiplique mmol/L por 38,7. Para convertir mmol/L de triglicéridos a mg/dL, multiplique mmol/L por 88,6.

TABLA 2
Distribución porcentual de la población de inmigrantes chinos según los puntos de corte para lípidos y lipoproteínas recomendados para población Asiática

Variable	Total ^a (n=50)	Hombres ^a (n=20)	Mujeres ^a (n=30)	Valor de p*
Colesterol Total				
< 4,39 mmol/L	41	26	55	0.0873
4,39-5,15 mmol/L	24	32	16	0.3314
≥ 5,16 mmol/L	35	41	29	0.5731
Colesterol LDL				
< 2,33 mmol/L	26	16	35	0.2582
2,33-2,83 mmol/L	23	21	26	0.9525
≥ 2,84 mmol/L	51	63	39	0.1754
Colesterol HDL				
≤ 0,90 mmol/L	15	21	10	0.5068
>0,90 mmol/L	85	79	90	0.5087
Índice de Castelli				
≤ 4.5	59	47	61	0.0181
> 4.5	41	53	29	0.0012
Triglicéridos				
< 1,69 mmol/L	64	53	74	0.2252
≥ 1,69 mmol/L	36	47	26	0.2295

* Probado con análisis de t-Student, p>0,05=no significativo. Para convertir mmol/L de colesterol a mg/dL multiplique mmol/L por 38,7. Para convertir mmol/L de triglicéridos a mg/dL, multiplique mmol/L por 88,6.

En promedio el Índice de Castelli (CT/HDL-C) fue 4,3 ± 1,2: no obstante este valor fue significativamente mayor en los hombres con respecto al promedio evidenciado en las mujeres (4,8 ± 1,5 y 3,9 ± 1,2 respectivamente, p= 0,018). Además, la proporción de hombres con un Índice de Castelli >4,5 fue significativamente mayor que la de mujeres (53% y 29% respectivamente, p= 0,0012).

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la frecuencia de consumo de alimentos. Cerca del 80% de los (as) chinos (as) inmigrantes consumen vegetales 5-6 veces/semana. Asimismo, alrededor del 30% consume con la misma frecuencia productos del mar y cerca del 20% consume pollo con la misma frecuencia. En general, alrededor del 50% de los inmigrantes consumen frutas 5-6 veces/semana. Sin embargo, la proporción de hombres y mujeres que mantienen este patrón de consumo es significativamente diferente (42% y 55% respectivamente, p=0,001). Por otro lado, solamente cerca del 30% de los inmigrantes consumen 1-2 veces por semana productos de soya (tofu, nato, miso y leche de soya), el 70% restante no los consume. Cabe destacar que alrededor del 23% de los inmigrantes consumen frecuentemente comidas rápidas (hamburguesas, perros clientes, papas fritas, pollo frito, pizza, burritos, tacos, empanadas y arreglados) y snacks (chocolates, estruidos de maíz y trigo, pastelés rellenos, golosinas, y repostería en pasta de hojaldre). La proporción de hombres que consumen estos alimentos 5-6 veces/ semana fue significativamente mayor que la proporción de mujeres que incluyen con esa frecuencia tales alimentos a la dieta (13% y 2% respectivamente, p=0,001). Cerca del 35% de los inmigrantes chinos consumen carne de res más de tres veces por semana y el 96% utiliza exclusivamente aceite de soya para cocinar y el 4% manteca de palma africana. Más del 60% nunca consume leguminosas, embutidos, gaseosas, comidas rápidas y snacks.

DISCUSION

Este estudio evidencia que más del 50% de los inmigrantes chinos, principalmente los hombres, presentan un perfil lipídico adverso. El nivel promedio de colesterol evidenciado en nuestra muestra es similar al observado en chinos residentes en Hong Kong (15), donde los niveles plasmáticos de lípidos son cercanos a los reportados en occidente. Para 1997 el nivel promedio de colesterol total en adultos de Hong Kong fue 5,04 mmol/L(15), tan sólo 0,21 mmol/L menos que el promedio reportado para adultos estadounidenses (4). Esto sugiere que a pesar de mantener algunas características de su cultura alimentaria (frecuente consumo de productos de origen vegetal) los inmigrantes chinos han modificado su patrón alimentario convirtiéndolo en uno más aterogénico.

TABLA 3
Frecuencia de consumo (veces/semana) de algunos alimentos en la población estudiada

Alimento	Hombres	Mujeres	Valor de p
Frutas			
Nunca	6	3	0.075
1-2 v/s	31	20	0.023
3-4 v/s	21	22	0.292
5-6 v/s	42	55	0.001
Vegetales			
Nunca	0	3	0.236
1-2 v/s	10	3	0.154
3-4 v/s	16	10	0.256
5-6 v/s	74	84	0.347
Productos de soya¹			
Nunca	74	66	0.561
1-2 v/s	26	34	0.498
3-4 v/s	0	0	0.856
5-6 v/s	0	0	0.856
Leguminosas			
Nunca	63	61	0.068
1-2 v/s	32	33	0.479
3-4 v/s	0	3	0.056
5-6 v/s	5	3	0.437
Productos del mar			
Nunca	0	6	0.085
1-2 v/s	47	36	0.126
3-4 v/s	21	29	0.562
5-6 v/s	32	29	0.065
Embutidos			
Nunca	58	74	0.561
1-2 v/s	26	20	0.077
3-4 v/s	11	6	0.052
5-6 v/s	5	0	0.069
Huevos			
Nunca	15	19	0.564
1-2 v/s	42	41	0.956
3-4 v/s	21	20	0.436
5-6 v/s	22	20	0.256
Pollo			
Nunca	0	13	0.023
1-2 v/s	53	35	0.049
3-4 v/s	26	29	0.073
5-6 v/s	21	23	0.569
Res			
Nunca	11	15	0.275
1-2 v/s	47	51	0.074
3-4 v/s	26	22	0.056
5-6 v/s	16	12	0.771
Comidas rápidas			
Nunca	58	68	0.088
1-2 v/s	11	14	0.691
3-4 v/s	24	15	0.146
5-6 v/s	7	3	0.275
Snacks³			
Nunca	68	72	0.459
1-2 v/s	16	16	0.957
3-4 v/s	3	10	0.849
5-6 v/s	13	2	0.001

¹ Incluye: leche de soya, tofu, miso y nato; ² Incluye: hamburguesas, perros calientes, papas fritas, pollo frito, pizza, burritos, tacos, empanadas y arreglados.

³ Incluye: chocolates, estruados de maíz y trigo, pasteles rellenos, golosinas, y repostería en pasta de hojaldre.

Nuestros datos señalan que en el patrón alimentario de estos inmigrantes, principalmente en el de los hombres se han incorporado alimentos ricos en grasa saturada propios de la cultura occidental como comidas rápidas (perros calientes, hamburguesas, papas fritas, pollo frito, pizza, entre otros) y los snacks (chocolates, estruados de maíz y trigo, pasteles rellenos, confites y otros). Esto podría explicar, al menos en parte, por qué el perfil de lípidos y lipoproteínas tiende a ser más adverso en los hombres.

Además, nuestros datos muestran un consumo frecuente de proteína animal. En el área rural de China, donde habita más del 75% de la población (1,2), el aporte de proteína animal a la dieta es menos de 11% del consumo total de proteínas (aproximadamente 66g/d) (3). De acuerdo con los resultados de la frecuencia de consumo, se puede señalar que en la dieta de los inmigrantes chinos el aporte de proteína animal es mayor. Esto contribuye a explicar las concentraciones de lípidos y lipoproteínas evidenciados, pues ha sido demostrado que en chinos que mantienen una dieta tradicional, un consumo pequeño de carne genera un incremento importante en el nivel de colesterol plasmático (3). Campbell, *et al.* (4) han demostrado que el consumo de carne, está asociado con un incremento en el nivel de la apolipoproteína B, la cual es marcadamente aterogénica (18).

Por otro lado, la limitada disponibilidad de algunos alimentos de soya (tofu, nato, miso y otros) en Costa Rica ha hecho que los inmigrantes modifiquen sin otra alternativa su patrón de consumo. Algunos estudios indican que el consumo de soya puede ser utilizado como un marcador de factores asociados con inmigración o con el grado de occidentalización de la dieta (19). De hecho, se ha evidenciado que el consumo de alimentos de soya se reduce en más del 90% en los inmigrantes asiáticos (19). Este comportamiento alimentario se refleja en nuestros datos de consumo, pues solamente una minoría de los inmigrantes chinos los consume y con una frecuencia de tan solo 1-2 veces/semana.

Es interesante destacar que más del 60% de los inmigrantes han dejado de consumir leguminosas, un alimento tradicional de su dieta (3), a pesar de la amplia disponibilidad de estos alimentos (incluyendo frijol de soya) en el mercado costarricense. Esto es particularmente importante pues el consumo de leguminosas esta inversamente asociado con los niveles de la apolipoproteína B (4).

La modificación del patrón alimentario de los inmigrantes chinos tiene importantes repercusiones en el perfil de lípidos, pues la reducción del consumo de soya y leguminosas se asocia a un mayor riesgo coronario (20-,22). Asimismo, la inclusión de alimentos ricos en grasa saturada y proteína animal, favorecen el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (23). Esto es de mayor interés en los hombres, pues además

de presentar con mayor frecuencia un perfil lipídico adverso, también mostraron una mayor prevalencia de sobrepeso. En Costa Rica se reporta para algunas áreas urbanas una prevalencia de obesidad en hombres adultos superior al 60% (24) y para mujeres a nivel nacional una prevalencia del 46% (25). Además, Klatsky y Armstrong al estudiar los factores de riesgo cardiovascular entre asiáticos americanos del norte de California, encontraron también índices de masa corporal más altos en hombres que en mujeres (11). De continuar con el estilo de vida actual, la incidencia de infarto al miocardio podría incrementarse en el grupo de sexo masculino, pues el exceso de grasa corporal, es un factor de riesgo independiente de la enfermedad cardiovascular (26).

Para este estudio utilizamos los parámetros establecidos para evaluar las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en habitantes del continente Asiático. Sin embargo, se podría pensar que debido a su inmigración sería más conveniente analizar los datos según los criterios occidentales del Programa Nacional de Educación en Colesterol (NCEP) de los Estados Unidos (27). No obstante, los niveles establecidos para asiáticos, están basados en sus hábitos alimentarios, los cuales se asocian a una tasa de mortalidad por enfermedad coronaria inferior al 15% (3). Por tanto, consideramos que la evaluación con puntos de corte más elevados, sería aceptar como adecuado el incremento de la aterogenicidad de la dieta. Además, recientemente se ha evidenciado que la disfunción endotelial ocurre en individuos sanos con niveles "normales" de colesterol ($< 5,17$ mmol/L) (28,29). Se ha indicado, por lo tanto, que para prevenir completamente la enfermedad coronaria debería mantenerse el colesterol plasmático en niveles inferiores a $3,88$ mmol/L (4), un criterio más estricto que el parámetro establecido para asiáticos ($< 4,39$ mmol/L) (14).

Es bien conocido que la producción de estrógenos en las mujeres de edad fértil estimula la síntesis de HDL-Colesterol incrementando sus valores en plasma (18). Las mujeres de origen chino presentaron niveles promedio de HDL-Colesterol similares a los hombres ($1,21$ mmol/L y $1,08$ mmol/L respectivamente; $p= 0,1230$), a pesar de que la mayoría de ellas probablemente sean pre-menopáusicas. Este fenómeno podría deberse al bajo poder que tiene la muestra del estudio ($n=50$). Probablemente si el número de individuos participantes en esta investigación hubiera sido mayor esa diferencia observada en los niveles de HDL-C sí hubiera sido significativa entre ambos sexos.

Es esencial que los nutricionistas y otros profesionales del área evalúen con mayor detalle los factores asociados al cambio de patrón alimentario en inmigrantes para definir cual variable tiene mayor impacto en la modificación de su perfil de lípidos. La prevención o retraso de esa modificación puede evitar un aumento en las tasas de morbi-mortalidad por enfermedad coronaria en ese grupo.

Es importante promover en los inmigrantes chinos el valor

de su cultura alimentaria, particularmente en los niños descendientes de éstos, pues ellos adoptan más rápidamente la "nueva" cultura alimentaria según lo demuestran los estudios con refugiados de Cambodia, Laos y del sur de Vietnam en los Estados Unidos (28,31). El proceso de occidentalización de la dieta en los adultos es más lento pues su cultura alimentaria es símbolo de etnicidad y deseo de mantener una identidad de grupo. Además, es una forma de unión con el pasado (30,32). Por tanto, la persuasión para mantener su patrón alimentario es una tarea relativamente sencilla para los nutricionistas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Fiorella Fortado, Alfredo Artavia y Walter Bi Chang por su valiosa colaboración en la recolección de las muestras de sangre. Asimismo agradecen a la Asociación China Costarricense, Biocientífica Internacional S.R.L. y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo y financiamiento brindado para la ejecución de este estudio. (Proyecto N° 430-AO-047) Además, desean agradecer especialmente a la Dra. María Laura Arias por la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Serie de documentos técnicos 797. Ginebra: OMS;1990.
2. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA project: registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in 4 continents. *Circulation* 1994;90:583-612.
3. Campbell TC, Junshi C. Diet and chronic degenerative diseases: perspectives from China. *Am J Clin Nutr* 1994;59 (Suppl 5):1153S-1161S.
4. Campbell TC, Parpia B, Chen J. Diet : lifestyle and the etiology of coronary artery disease: The Cornell China Study. *Am J Cardiol* 1998;82:18T-21T.
5. Klatsky AL, Tekawa IS, Armstrong MA. Cardiovascular risk factors among Asian Americans. *Public Health Rep* 1996;111 (Suppl 2):62S-64S.
6. Winkleby MA, Kraemer HC, Ahn DK, Varady AN. Ethnic and Socioeconomic Differences in Cardiovascular Disease Risk Factors. *JAMA* 1998;280(4):356-362.
7. Budoff MJ, Yang TP, Shavelle RM, Lamont DH, Brundage BH. Ethnic differences in coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(3):408-12.
8. Woo KS, Chook P, Raitakari OT, McQuillan B, Feng JZ, Celermajer DS. Westernization of Chinese Adults and Increased Subclinical Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2487-2493.

9. Robertson T, Kato H, Rhoads G. Epidemiology studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. *Am J Cardiol* 1997;39: 239-243.
10. Yu ES. The health risks of Asian Americans. *Am J Public Health*. 1991;81(11):1423-8.
11. Klatsky AL, Armstrong MA. Cardiovascular risk factors among Asian Americans living in northern California. *Am J Public Health* 1991;81(11):1391-3.
12. World Health Organization. World health statistics annual 1994. Geneva: WHO, 1995:B10-B33.
13. Rodríguez N, Meza N. Consumo de grasa y riesgo para la salud. *Rev Cost Salud Pública* 1995;4:12-16.
14. Lohman TC, Roche AS, Martorell R (Eds). *Antropometric standarization reference manual*. Champaign, IL: Human Kinetics, 1988.
15. Tomlinson B, Pang C, Chan P. Hyperlipidemia in China population. *Hospital Medicine* 1998;597-14.
16. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparative centrifuge. *Clin Chem* 1975;18:499-502.
17. Singh RB, Mori H, Chen J. Recommendations for the prevention of coronary artery disease in Asian: A scientific statement of the International College of Nutrition. *J Cardiovasc Risk* 1996;6:489-494.
18. Ginsberg H. Metabolismo de lipoproteínas y su relación con la aterosclerosis. En: Hunninghahe D. Ed. *Clínicas Médicas de Norteamérica: Dislipidemias*. México:Interamericana 1994;1-22.
19. Wu AH, Ziegler RG, Normura A. Soy intake and risk of breast cancer in Asian and Asian Americans. *Am J Clin Nutr* 1998;68 (Suppl):1437S-1443S.
20. Anthony M, Clarkson T, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1998;68 (Suppl):1390S-1393S.
21. Wilson P, Castelli W, Kannel W. Coronary risk prediction in adults: The Framingham Heart Study. *Am J Cardiol* 1987;59:9-14.
22. Satia JA, Patterson RE, Herrero R, Jin F, Dai Q, King IB, Chen Ch, Kristal AR, Prentice RL, Rossing MA. Study of diet, biomarkers and cancer risk in the United States, China and Costa Rica. *Int J Cancer* 1999;82:28-32.
23. Fraser G. Diet and coronary heart disease: beyond dietary fats and low density- lipoprotein cholesterol. *Am J Clin Nutr* 1994;59 (Suppl):1117S-1123S.
24. Ministerio de Salud. Encuesta Basal: Sitio Centinela Damas. San José, Costa Rica, 1999.
25. Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de nutrición. Fascículo 1: Antropometría. San José, Costa Rica. 1996.
26. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: A 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-977.
27. National Cholesterol Education Program. Report of the expert panel on detection, evolution, and treatment on high blood cholesterol in adults. *Arch Intern Med* 1998; 148:36-69.
28. Creager M, Selwyn A. When "normal" cholesterol levels injure the endothelium. *Circulation* 1997;96:3255-3257.
29. Steinberg H, Bayazed B, Hook G. Endothelium dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation* 1997;96:3287-3293.
30. Story M, Hanis LJ. Food habits and dietary change of Southeast Asian refugee families living in the United States. *J Am Diet Assoc* 1989;89:800-803.
31. Crane NT, Green NR. Food habits and food preferences of Vietnamese refugees living in northern Florida. *J Am Diet Assoc* 1980;76:591-593.
32. Hsu-Hage BH, Wahlqvist ML. Cardiovascular risk in adult Melbourne Chinese. *Aust J Public Health* 1993;17(4):306-13.

Recibido:15-01-2001

Aceptado:26-04-2002

Nutritional supplementation according to energy and protein requirements in malnourished HIV-infected patients

Victor Charlin, Fernando Carrasco, Cecilia Sepúlveda, María Torres, Juan Kehr

Dr. José Joaquín Aguirre Hospital, University of Chile, Santiago - Chile. San Juan de Dios Hospital, Santiago - Chile

SUMMARY. To evaluate the effects of nutritional supplements on nitrogen and energy balances, body composition and immune parameters, HIV-infected malnourished adult outpatients were prospectively studied. Forty-six patients (4 females and 42 males; 37 ± 12 y) were supplemented with a polymeric diet (PD) or regular foods (RF) on two consecutive 45-day periods on a crossover design. Weight, skinfold thicknesses, plasma albumin (PA), CD4 and CD8 lymphocyte counts (LC), resting energy expenditure (REE) and urinary nitrogen excretion were measured at baseline, 45 and 90-day. Food intake was weekly recorded by food surveys. Thirty-five patients completed the protocol (18 in Group 1: PD \rightarrow RF; 17 in Group 2: RF \rightarrow PD). In both groups, weight, fat free mass (FFM), energy balance (EB) and nitrogen balance (NB) increased significantly after PD, whereas LC and PA remained unchanged in both groups. The best results in terms of weight gain were obtained in the PD group and PD plus zidovudine subgroup ($n=8$) during the first 45 days (weight gain/FFM gain: 4.8/2.6 kg and 6.8/3.1 kg, respectively). Nutritional supplement with PD, according to the EB and NB goals, was well tolerated and permitted to achieve a significant weight and FFM gain over a 90-day follow-up.

Key words: HIV, resting energy expenditure, weight gain, body composition, nutritional supplement.

RESUMEN. Suplementación nutricional de acuerdo al requerimiento energético y proteico medido en pacientes HIV-positivo. Para evaluar los efectos de la suplementación nutricional en los balances nitrogenado (BN) y energético (BE), composición corporal y parámetros inmunológicos, se estudió prospectivamente a adultos HIV positivos con desnutrición. 46 pacientes (4 mujeres y 42 hombres; 37 ± 12 años), fueron suplementados con dieta polimérica (DP), o alimentos habituales (AH), en 2 períodos consecutivos de 45 días, con un diseño cruzado. Al inicio, día 45 y día 90 se midió peso, pliegues cutáneos, albuminemia (A), linfocitos CD4 y CD8 (L), gasto energético de reposo (GER), y nitrógeno ureico urinario. Se efectuó encuesta alimentaria semanalmente. 35 pacientes completaron el estudio (18 en grupo 1: DP \rightarrow AH; 17 en grupo 2: AH \rightarrow DP). Después de los 45 días con DP aumentó significativamente el peso, masa libre de grasa (MLG), BE y BN en ambos grupos. L y A no varió significativamente en ninguno de los grupos. Los mejores resultados en términos de ganancia de peso fueron obtenidos en el grupo 1 y en el subgrupo con DP más AZT ($n=8$), con una ganancia de peso/MLG de 4.8/2.6 kg y 6.8/3.1 kg, respectivamente. La suplementación con DP, de acuerdo a metas de BE y BN, fue bien tolerada y permitió una ganancia de peso y masa libre de grasa significativa en un período de 90 días.

Palabras clave: VIH, gasto energético de reposo, ganancia de peso, composición corporal, suplementación nutricional.

INTRODUCTION

Malnutrition with progressive wasting of body cell mass is a major feature of AIDS (1-4). This disease is characterised by moderate to severe metabolic stress similar to critically ill patients (5-7). This is associated to decreased oral intake secondary to anorexia (2,3,8,9), and to malabsorption (10,11). Such hypermetabolic condition has also been found in clinically stable AIDS patients (5-7,12). A weak correlation with viral load measured by plasma HIV RNA contents and with antiretroviral therapy has been found (13).

Both weight loss and a low serum albumin concentration (14) are predictive of increased risk of morbidity and decreased survival in AIDS patients. Nutritional support is hoped to improve immune system function and reduce the incidence of opportunistic infections. Also, it can improve the efficacy

of drug therapies and contribute to a better patient's quality of life (15).

The aim of this study was to analyse the impact of two forms of dietary supplementation on the nutritional recovery, energy balance, and nitrogen balance in HIV+ malnourished patients over a 90-day period.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Forty-six HIV-infected adults outpatients (37 ± 12 years old; 4 females and 42 males), from the AIDS wards in the "José Joaquín Aguirre" and "San Juan de Dios" Hospitals in Santiago were studied prospectively between September 1994 and August 1995. All patients had calorie-protein malnutrition according to the Body Mass Index (BMI) (low to 20 kg/m^2).

Eleven patients were in A or B category and thirty-five patients had a positive diagnosis of AIDS ("C" category) according to the guidelines issued by the Atlanta's Centre for Disease Control in 1992 (16).

The experimental design corresponded to a prospective randomised cross-over study. Patients were given two types of dietary supplements in random order, consisting of regular foods (RF) or of a polymeric diet (PD;ADN^R), over two consecutive periods of 45 days. **Group 1** (n=21): patients received a polymeric diet during the first period and then regular foods. **Group 2** (n=25): patients were supplied with RF during the first period and then with PD. Clinical characteristics of the two groups at admission to the study are presented in Table 1. Table 2 shows selected nutritional and immunological parameters of the 46 patients at baseline.

TABLE 1
Characteristics and diagnosis of the study population

	Group 1	Group 2
Number of patients	21	25
Age (y)	38.2 ± 11.5 *	37.7 ± 12.5*
Sex ratio (F:M)	2 : 19	2 : 23
AZT (yes / no)	11 / 10	12 / 9
N° of clinical illness	14	14
Candidiasis	4	4
<i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia	3	4
Toxoplasmosis	2	2
Kaposi's sarcoma	2	1
Chronic diarrhea	1	2
Meningitis	1	0
Tuberculosis	1	0
Oral leukoplakia	0	1

* mean ± standard deviation.

AZT: zidovudine therapy.

Analyses

The following parameters were evaluated at the beginning, and on 45th and 90th days of the study: weight, height, and skinfold measurements (triceps, biceps, subscapular and suprailliac). Fat mass (FM%) was calculated by applying the sum of the skinfolds and the Durnin and Womersley tables (17). Fat free mass (FFM) was calculated by difference between body weight and fat mass.

CD4 and CD8 lymphocyte counts were obtained from peripheral blood by cytometric flow. Plasma albumin concentrations were measured by the modified Biuret method (18).

Twenty-four hours urinary ureic nitrogen (UUN) was determined by the urease method. Resting Energy Expendi-

ture (REE) was determined by open circuit indirect calorimetry, with Hans RudolphTM facial mask, Douglas bag, Haloscale Wright RespirometerTM and Scholander gas microanalyses (19). Oxygen consumption (VO₂), CO₂ production (VCO₂), and REE were calculated according to Weir formula (18). Predicted energy expenditure (PEE) was obtained by the Harris and Benedict's equations (20).

Nutritional intake was recorded by 24-hour recall taken on three alternate days before the beginning of the study and during all the supplementation period. Energy and protein intakes were calculated by using the chemical composition tables of Chilean foods (21). With the data obtained, the following parameters were calculated:

- Energy Balance (EB) = Energy Intake (EI) - (REE x 1.3)
- Nitrogen Balance (NB) = Nitrogen intake* (NI) (g/d)-(UUN + 4)
- NI= protein intake / 6.25

TABLE 2
Baseline clinical characteristics of the study population

	All patients n=46	Group 1 n=21	Group 2 n=25
WEIGHT (kg)	54.2±5.7	52.7±5.5	55.4±5.6
BMI (kg/m ²)	18.6±1.3	18.5±1.4	18.6±1.2
FM % (SKF)	16.9±5.5	17.6±5.7	16.4±5.4
REE (kcal/kg/d)	24.6±4.6	25.3±5.6	23.9±3.4
REE/PEE (%)	94.1±15.8	96.8±17.8	91.8±13.6
EI (kcal/kg/d)	30.4±8.8	34.2±8.8 *	27.2±7.5 *
EB (kcal/kg/d)	-1.6±9.0	1.3±9.4 *	-4.0±7.8 *
NI (g/kg/d)	0.18±0.07	0.21±0.09*	0.16±0.05*
NB (g/kg/d)	-11.6±4.7	-12.8±6.2	-10.6±2.6
Albumin (g/dl)	3.5±0.6	3.7±0.7	3.4±0.6
CD4 (x 10 ⁶ /L)	176±203	134±126	211±244
CD8 (x 10 ⁶ /L)	617±490	463±357	747±546

Mean ± standard deviation. * Significantly different between both groups (p<0.05). BMI= body mass index; FM= fat mass by skinfolds; REE= resting energy expenditure by indirect calorimetry; PEE= predicted resting energy expenditure by Harris and Benedict equation; EI = energy intake; EB= energy balance; NI= nitrogen intake; NB= nitrogen balance; Alb= plasma albumin.

Dietary supplementation

Dietary supplements were given in random order, consisting of regular foods (cereals, dairy products, eggs albumin; ≅ 15% of protein contribution to total energy), or of a powdered polymeric diet at 22% water dilution (ADN^R, Davis SA Laboratories, Braun Co.). Polymeric diet presents the following composition per 10 dl: 103 kcal, 3.6 g of protein (sodium and calcium caseinate; 14% of contribution to total energy), 13.0 g. of carbohydrates (maltodextrins) and 4.0 g of lipids (sunflower seed oil and coconut oil). This formula

covers vitamin and micronutrient US-RDA requirements for an adult with 200 dl per day.

Energy and protein needs for supplementation were calculated as follow:

- Energy supplementation (kcal/d) = (REE x 1.5*) - EI
- *30%: physical activity plus thermogenesis; 20%: anabolism.
- Protein supplementation (g/d) = ((UUN+4)+5*) - NI x 6.25
- *5 nitrogen g for to achieve a positive balance.

Clinical evaluation and antiretroviral therapy

Systemic signs and symptoms were registered for each day of the study. Also it was recorded the presence of AID's related diseases at the entry and during the intervention periods, and as well as the prescription of antiretroviral drugs. AZT therapy (zidovudine) was present before baseline as monotherapy in almost a half of patients (Table 1) and it was maintained during all the study.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation. ANOVA for repeated measures was applied in order to evaluate changes on time, baseline, 45-day and 90-day of the study. The mean changes between treatment periods with polymeric or regular food supplementation, or between patients with and without AZT therapy, were compared by Student's t-test for independent samples. Jandel Sigma Stat Version 2.0 and Stats Plus Version B384 software was used for the statistical analysis.

RESULTS

Of the forty-six initial patients, eleven died between the 10th and 45th day of the follow-up (3 in group 1; 8 in Group 2).

These patients presented 1 to 4 AIDS-associated illnesses (21 diseases during the evolution): *pneumocystis carinii* pneumonia (4), oropharyngeal candidiasis (5), toxoplasmosis (3), Kaposi's sarcoma (3), chronic diarrhoea (2), lymphoma (1), cryptococcus meningitis (1), tuberculosis (1), and encephalic herpes (1). There was no significant difference on nutritional and immune parameters between survivors and non-survivors patients, although the latter presented greater frequency of diseases.

Thirty-five patients completed the 90-day supplementation period (Table 3). A significant increase of weight, BMI, and FFM was observed in both groups, and FM% in group 2, over the 90-day period. There were no significant variations in plasma albumin, CD4 and CD8 lymphocyte counts. Average weight gain of 5.7 and 3.7 kg (3.2 and 1.7 kg of FFM) was observed over the 90-day period in Group 1 and Group 2, respectively. Taking the entire treatment periods, regardless the sequence of supplementation, the increases were 3.7 \pm 3.4 vs. 0.8 \pm 3.6 kg on weight, 2.1 \pm 2.4 vs. 0.51 \pm 2.2 kg on FFM, and 0.03 \pm 0.59 vs. -0.13 \pm 0.49 g/dl on plasma albumin levels, in PD and RF periods, respectively. Differences were significant.

TABLE 3
Anthropometrical and laboratory parameters of patients on 90 days following

	Baseline	Group 1 (n=18)		Group 2 (n=17)		
		45-Day	90-Day	Baseline	45-Day	90-Day
WEIGHT (kg)	52.7 \pm 5.5	57.5 \pm 6.3 ¹	58.4 \pm 9.0	56.2 \pm 5.5	57.7 \pm 6.9	59.9 \pm 8.1 ²
BMI (kg/m ²)	18.6 \pm 1.4	20.2 \pm 1.8 ¹	20.5 \pm 2.7	18.8 \pm 1.1	19.3 \pm 1.4	20.0 \pm 1.9 ²
FM (%)	17.9 \pm 6.1	20.0 \pm 7.5	19.7 \pm 8.3	16.9 \pm 6.1	17.9 \pm 4.8	19.0 \pm 4.8 ²
FFM (kg)	43.2 \pm 4.3	45.8 \pm 4.2 ¹	46.4 \pm 5.0	46.7 \pm 5.2	47.3 \pm 5.7	48.4 \pm 6.4 ²
Alb (g/dl)	3.5 \pm 0.6	3.4 \pm 0.5	3.3 \pm 0.7	3.7 \pm 0.7	3.5 \pm 0.7	3.5 \pm 0.5
CD4 (x10 ⁶ /L)	139 \pm 128	131 \pm 139	119 \pm 135	247 \pm 285	245 \pm 271	241 \pm 271
CD8 (x10 ⁶ /L)	608 \pm 378	679 \pm 708	709 \pm 733	833 \pm 695	799 \pm 635	856 \pm 786

Mean \pm standard deviation. BMI=body mass index;FM=fat mass;FFM=fat free mass;Alb=plasma albumin; ^{1,2,3} ANOVA significance (p<0.05): ¹ from baseline after the first 45 days with polymeric diet (Group 1); ² from 45-day measures after the second period with polymeric diet (Group 2); ³ from baseline after 90 days of supplementation (Group 1 and Group 2)

The mean of supplemented energy over the first period was 274 kcal/d of PD (13.6% of energy intake; group 1) and 538 kcal/d of RF (34.2% of EI; group 2). In this period energy intake increased by 268 and 97 kcal/d with PD and RF, respectively. On the second period the mean of supplemented energy was 388 kcal/d of PD (15.8% of EI; group 2) and 312 kcal/d of RF (15.4% of EI; group 1), and the EI increased by

875 and -26 kcal/d with PD and RF, respectively.

There were significant increases on energy balance with PD in both groups (EB: +224 kcal in group 1; +826 kcal/d in group 2), and with RF in group 1 (EB: -461 kcal/d). Nitrogen balances increased in both groups (significant on PD period in group 1 and after 90-day period in group 2) (Table 4).

TABLE 4
Metabolic and dietary parameters of patients on 90 days following

	Group 1 (n=18)			Group 2 (n=17)		
	Baseline	45-Day	90-Day	Baseline	45-Day	90-Day
REE (kcal/kg)	25.8±5.9	23.9±6.4	20.6±2.7	24.2±2.2	22.6±4.2	20.9±3.2
REE/FFM	31.3±5.9	30.1±8.1	25.8±3.3 ³	29.2±3.2	27.6±5.3	25.8±3.7 ³
REE/PEE (%)	98.1±18.7	95.8±28.1	82.7±13.1 ³	94.6±12.6	89.2±16.7	83.6±14.1 ³
EI (kcal/kg)	33.0±8.6	34.9±6.9	34.8±11.7	26.3±6.3	27.3±5.9	40.9±7.7 ²
EB (kcal/kg)	-0.5±8.5	3.9±9.9 ¹	7.9±11.0	-5.2±6.7	-2.1±8.2	13.8±8.5 ²
UUN (g/d)	8.9±6.1	7.7±4.0	6.8±3.4	6.5±2.5	5.6±2.6	5.9±2.6
NI (g/kg/d)	0.19±0.07	0.22±0.06	0.23±0.06	0.15±0.04	0.19±0.05	0.25±0.07 ²
BN (g/kg/d)	-0.06±0.15	0.01±0.08 ¹	0.03±0.12	-0.04±0.04	0.02±0.06	0.07±0.1 ³

Mean ± standard deviation. REE:resting energy expenditure; PEE=predicted resting energy expenditure by Harris and Benedict equation; EI=energy intake; EB=energy balance; UUN=urinary ureic nitrogen excretion;NI= nitrogen intake;NB= nitrogen balance. ^{1,2,3} ANOVA significance (p<0.05): ¹ from baseline after the first 45 days with polymeric diet (Group 1); ² from 45-day measures after the second period with polymeric diet (Group 2); ³ from baseline after 90 days of supplementation (Group 1 and Group 2).

Patients with normal (90%-109%), or high REE/PEE% (≥110%) at the entry of the study showed a significant reduction on mean REE/PEE% at the 45-day and 90-day evaluations (Table 5). There were no significant differences in baseline characteristics among groups according to REE/PEE%.

TABLE 5
Characteristics of subjects clustered by initial metabolic level (REE/PEE %) during 90 days of dietary supplementation

	< 90 % (n=10)	90-109 % (n=20)	≥ 110 % (n=5)
Baseline REE/PEE%	79.0±8.0	98.0±7.0	125.0±13.0
45-day REE/PEE%	79.6±14.8	96.0±22.4	104.5±30.0
90-day REE/PEE%	76.2±10.1	85.8±12.8 ¹	86.5±17.2 ¹
BMI (kg/m ²)	18.5±1.3	18.9±0.1	17.8±1.9
FM (%)	17.1±5.5	17.8±5.2	16.5±8.0
ALB (g/dl)	3.3±0.6	3.6±0.6	3.8±0.8
CD4 (xmm ³)	125±142	138±120	299±317
CD8 (xmm ³)	533±270	615±554	735±462
n° illnesses *	3	5	1

REE/PEE %: resting energy expenditure as % of predicted energy expenditure (PEE) by Harris and Benedict equation. BMI: body mass index; FM: fat mass.

* infectious illnesses at entry to the study, including: *pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, encephalic herpes, meningitis.

¹ significantly lower than baseline and 45-day averages.

The systemic signs and symptoms (% of observation days: both groups-PD period/both groups-RF period) were: disguise (24/25%), anorexia (17/20%), dysphagia (14/20%), chewing pain (11/19%), nausea (14/16%), diarrhoea (10/11%), and

vomiting (5/11%). There was no significant difference of frequency of signs and symptoms between both periods of supplementation.

Of the thirty-five patients whom completed the study, patients with AZT therapy (8 in group 1 and 8 in group 2) were compared to non-AZT patients (10 in group 1 and 9 in group 2). No significant differences were observed on nutritional and immunological baseline parameters. Although there was a greater non-significant increase on body weight in AZT (3.96±3.73 kg) than non-AZT patients (2.55±3.37 kg) during the first 45-day period, the composition of the weight gain was very similar (50.3 vs. 53.7% of FFM, respectively). On the first 45 days, only group 1 (PD) had higher weight gain (6.8±3.3 vs. 3.2±3.5 kg), energy intake (535±147 vs. 80±92 kcal/d), and energy balance (423±50 vs. 173±27 kcal/d) in AZT (+) patients compared to their AZT (-) counterparts.

DISCUSSION

Infectious complications can be the cause of mortality in AIDS patients. Nevertheless, malnutrition increases the risk of morbidity and mortality during the evolution of the illness, and it strongly predicts patient's survival regardless the immunology condition (4). In our study, there were no significant differences in nutritional status (BMI, FM%, serum albumin), immunological condition (CD4 lymphocyte counts), and REE among survivors and nonsurvivors patients. However, there were greater frequencies of infectious diseases like *pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, meningitis and encephalic herpes in nonsurvivors (7/11) compared to survivors (9/35).

Despite the well-known beneficial impact of maintaining or improving the weight, FFM, and serum albumin levels in AIDS patients, discrepancy exists about the efficacy and feasibility of nutritional supplementation. Results of hypercaloric feeding interventions indicate that the weight gained is predominantly fat mass (22). In a prospective study, Bürger et al (23) tested the effects of supplementation with a polymeric diet in 34 clinically stable HIV+ patients. These authors reported poor tolerance and a low correlation between formula intake and weight changes. Similar negative results were obtained by Hoh et al (24) on a 6-week supplementation trial with a polymeric diet (550-600 kcal/d), in thirty-nine HIV+ patients with associated wasting. Net protein and energy intake increases were not associated to increased mean FFM.

During a 6-month prospective study on fifty-five HIV-infected outpatients supplemented with a polymeric diet (606 kcal/d), Pichard et al (25) observed increased energy and nitrogen intakes, with excellent compliance and good tolerance. Also, a mean weight gain of 2 kg (50% of FFM), without change on CD4 and CD8 lymphocyte counts, viraemia or tumour necrosis factor receptors (used as inflammation parameters) were noted.

In the present study, patients achieved a mean weight gain of 4.7 kg (5.7 and 3.7 kg in group 1 and 2, respectively). 53% of weight gain corresponded to fat free mass (56% in group 1 and 46% in group 2), after 90 days of supplementation, without significant changes on CD4, CD8 and plasma albumin levels. Nonetheless, the method for evaluating body composition used in this study (skinfold thickness measurements) makes it impossible to know whether the increase of fat free mass corresponded to muscle mass or water. This nutritional recovery was obtained by increased energy and protein intakes, specially in patients with low initial food intake who were supplemented with a polymeric diet (Table 4), despite the presence of anorexia, dysgeusia, dysphagia, chewing pain, and/or diarrhoea. Observed mean energy intake increased by 1.8 and 14.6 kcal/kg/d (105 and 874 kcal/d), in group 1 and 2, respectively. Protein intake increased 0.25 g/kg/d and 0.63 g/kg/d (14.6 and 37.4 g/d) in group 1 and 2, respectively. It is suggested that these improvements were consequence of the use of a polymeric diet for supplementation (ADN[®]). This supplement permitted to fulfil the required prescription easier than with the intake of regular foods.

Recently, Sheehan et al (26) analysed prospectively variables such as energy intake, energy expenditure, weight change, CD4 count and clinical status of 33 HIV-positive men during a 3-y period. With a linear modelling analysis they concluded that the primary determinant of energy balance was energy intake, with a minor contribution of total energy expenditure. These results magnify the importance of nutritional support in HIV-positive and AIDS patients, and

the energy and protein intakes achieved in our study.

Yarchoan et al (27), observed that nucleoside analogues therapy such as AZT could explain at less partially, the body weight increase in patients with AIDS. No information about energy intake or body composition changes was available in that study. Other studies in patients treated with protease inhibitors showed significant greater weight gain than non-users of that therapy (28,29). However, weight gain was mostly fat mass in a dorsocervical and truncal distribution pattern (28,30).

In our patients (regardless the type of supplementation), there was a trend to a greater weight gain (and FFM) in AZT than non-AZT patients (although no significant), associated to increased energy and nitrogen intakes and balances. FFM was 50% and 54% of weight gain in AZT and non-AZT patients, respectively.

After the first 45 days of supplementation with a polymeric diet (group 1), AZT patients achieved greater significant weight gain than non-AZT patients (6.8 Vs 3.2 kg), this was related to greater energy intake and energy balance. Contribution of FFM to body weight gain was 41 and 46% in AZT and non-AZT patients, respectively. Polymeric diet supplementation plus AZT therapy showed to be the best combination for the nutritional recovery of our patients.

On the other hand, the resting energy expenditure in AIDS subjects showed great variability, which has not clearly been associated with the nutritional status, degree of immune impairment, presence of illnesses or weight loss history (31). In AIDS whether energy expenditure is increased or decreased depends on the balance among thermogenic factors (cytokine levels, fever, opportunistic infections), metabolic adaptation to a low energy intake and cachexia with fat free mass wasting (32). In our study, REEs at baseline evaluation in 48% of subjects were significantly different from those predicted by the Harris-Benedict equations ($REE/PEE < 90$ or $\geq 110\%$). Eleven percent of patients showed increased REE ($\geq 110\%$), whereas REE was decreased in 37% ($< 90\%$). These REEs were not associated to differences in nutritional status, CD4 and CD8 lymphocyte counts, frequency of infectious illnesses, or AZT therapy. At the end of study only two of thirty-five subjects presented increased REE without infectious diseases.

The reduction of resting energy expenditure during the course of treatment, both in absolute terms as well as expressed by fat free mass unit, could be explained by lower frequency of infectious diseases (9 before baseline measures, 5 during the first period, 4 during the second period).

The highly variable metabolic conditions observed during the evolution of the illness, suggests the importance of carrying out energy and nitrogen balance calculations by means of food surveys, nitrogen excretion determination, and indirect calorimetry.

CONCLUSIONS

The importance of adequate nutritional status on the survival and AIDS patient's quality of life is indisputable. Supplementation with a polymeric diet, according to energy and nitrogen requirements, should be considered for obtaining a better patient's tolerance and compliance in order to allow greater energy and protein intakes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the research Project FONDECYT 1940570 (Santiago, Chile), and the collaboration from Davis Laboratories, Braun Co, Chile. The trial was part of MS Torres graduate thesis for a Master of Biological Sciences (Nutrition), Faculty of Medicine, University of Chile.

REFERENCES

- Kotler DP, Wang J, Pierson RN. Body composition studies in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Clin Nutr* 1985;42:1255-1265.
- Ysselclyke LI. Nutritional complications and incidence of malnutrition among AIDS patients. *J Am Diet Assoc* 1991;91(2): 217-218.
- Trujillo EB, Borlase BC, Bell SJ, Guenther KJ, Swails W, Queen PM, Trujillo JR. Assessment of nutritional status, nutrient intake, and nutrition support in AIDS patients. *J Am Diet Assoc* 1992;92(4): 477-478.
- Kotler DP, Tierney AR, Wang J, Pierson RN. Magnitude of body cell mass depletion and timing of death from wasting in AIDS. *Am J Clin Nutr* 1989;50:444-447.
- Hommes MJ, Romijn JA, Godfried MH, Eeftinck-Schattenkerk JKM, Buurman WA, Endert E, Sauerwein HP. Increased resting energy expenditure in human immunodeficiency virus infected men. *Metabolism* 1990;39(11): 1186-1190.
- Melchior JC, Salmon D, Rigaud D, Lepout C, Bouvet E, Detruichis P, Vildé JL, Vachon F, Coulaud JP, Apfelbaum M. Resting energy expenditure is increased in stable, malnourished HIV-infected patients. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:437-441.
- Grunfeld C, Pang M, Shimizu L, Shigenaga, Jensen P, Feingold KR. Resting energy expenditure, caloric intake, and short-term weight change in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Clin Nutr* 1992;55:455-460.
- Gelb A, Miller S. AIDS and gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1986;81:619-622.
- Macallan DC, Noble C, Balwin C, Foskett M, McManus T, Griffin GE. Prospective analysis of patterns of weight change in stage IV human immunodeficiency virus infection. *Am J Clin Nutr* 1993;58(3):417-424.
- Dworkin B, Wormser GS, Rosenthal WS, Heier SK, Braunstein M, Weiss L, Jankowski R, Levy D, Weiselberg S. Gastrointestinal manifestation of AIDS. *Am J Gastroenterol* 1985;80(10):774-778.
- Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1984;101(4):421-428.
- Grinspoon S, Corcoran C, Miller K, Wang E, Hubbard J, Schoenfeld D, Anderson E, Basgoz N, Klibanski A. Determinants of increased energy expenditure in HIV-infected women. *Am J Clin Nutr* 1998;68(3):720-725.
- Shevitz AH, Knox TA, Spiegelman D, Roubenoff R, Gorbach SL, Skolnik PR. Elevated resting energy expenditure among HIV-seropositive persons receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1999;13(11):1351-1357.
- Chlebowski RT, Grosvenor MB, Bernhard NH, Morales LS, Bulcavage LM. Nutritional status, gastrointestinal dysfunction and survival in patients with AIDS. *Am J Gastroenterol* 1989;84 (10):1288-1293.
- Kotler DP: Nutritional effects and support in the patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J Nutr* 1992;122:723-727.
- Centres for Disease Control. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescent and adults. *MMWR* 1992;41:RR-17.
- Durnin JG, Womersley J. Body fat assess from total body density and fat estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974;32:77-79.
- Bernard J. Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. 8ª edición 1992. Salvat.
- Burstein S, Elwyn DH, Askanazi J, Kinney JM. The Theoretical Framework of Indirect Calorimetry and Energy Balance (chapter 2) and Methods of Measurement and Interpretation of Indirect Calorimetry (Chapter 5). In: *Energy Metabolism, Indirect Calorimetry, and Nutrition*. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland;1989:27-83 & 173-209.
- Harris JA, Benedict FJ. A biometric study of basal metabolism in man. Edited by Carnegie Institute of Washington, Publication n° 279. Washington DC;1919.
- Schmidt-Hebbel H, Pennacchiotti M, Masson L, Mella MA. *Tabla de Composición Química de Alimentos Chilenos*. Food Sciences and Chemical Technology Department, Chemical and Pharmaceuticals Sciences Faculty, University of Chile. Santiago, Chile;1990.
- Kotler DP. Nutritional alterations associated with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;25(1 Suppl):81-87.
- Bürger B, Schwenk A, Jünger H, Ollenschläger G, Wessel D, Diehl V, Schrappe M. Oral supplements in HIV-infected patients with chronic wasting. A prospective trial. *Med Klin* 1994;89(11):579-581.
- Hoh R, Pelfini A, Neese RA, Chan M, Cello JP, Cope FO, Abbruzese BC, Richards EW, Courtney K, Hellerstein MK. De novo lipogenesis predicts short-term body-composition response by bioelectrical impedance analysis to oral nutritional supplements in HIV-associated wasting. *Am J Clin Nutr* 1998;68(1):154-163.

25. Pichard C, Sudre P, Karsegard V, Yerly S, Slosman DO, Delley V, Perrin L, Hirschel B, Swiss HIV Cohort Study. A randomised double-blind controlled study of 6 months of oral nutritional supplementation with arginine and omega-3 fatty acids in HIV-infected patients. *AIDS* 1998;12(1):53-63.
26. Sheehan LA, Macallan DC. Determinants of energy intake and energy expenditure in HIV and AIDS. *Nutrition* 2000;16(2):101-106.
27. Yarchoan R, Weinhold K, Lyerly HK, Gelmann E, Blum RM, Shearer GM, Mitsuya H, Collins JM, Myers CE, Klecker RW, Markham PD, Durack DT, Lehrman SN, Barry DW, Fischl MA, Gallo RC, Bolognesi DP, Broder S. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1986;1:575-580.
28. Silva M, Skolnik PR, Gorbach SL, Spiegelman D, Wilson IB, Fernández-DiFranco MG, Knox TA. The effect of protease inhibitors on weight and body composition in HIV-infected patients. *AIDS* 1998;12(13):1645-1651.
29. Carbonnel F, Maslo C, Beaugerie L, Carrat F, Wirbel E, Aussel C, Gobert JG, Girard PM, Gendre JP, Cosnes J, Rozenbaum W. Effect of indinavir on HIV-related wasting. *AIDS* 1998;12(14):1777-1784.
30. Miller KD, Jones E, Yanovski JA, Shankar R, Feuerstein I, Falloon J. Visceral abdominal-fat accumulation associated with use of indinavir. *Lancet* 1998;351:871-875.
31. Süttmann U, Ockenga J, Hoogestraat L, Selberg O, Schedel I, Müller MJ. Resting energy expenditure and weight loss in human immunodeficiency virus-infected patients. *Metabolism* 1993;42(9):1173-1179.
32. Pi-Sunyer FX. Overnutrition and undernutrition as modifiers of metabolic processes in disease states. *Am J Clin Nutr* 2000;72(2 Suppl):533-537.

Recibido: 13-07-2001

Aceptado: 30-01-2002

Consumo de harina de maíz precocida y su aporte de hierro y vitamina A en preescolares de bajos recursos económicos

Sara del Real, María Concepción Páez, Liseti Solano, Zuleida Fajardo

Centro de Investigaciones en Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue evaluar si la adición de hierro y vitamina A (VA) a la harina de maíz precocida que se lleva a cabo a través del programa de enriquecimiento a nivel nacional desde 1993, logra que preescolares alcancen un consumo adecuado de estos nutrientes. Se evaluaron 196 niños (4-6 años) de Valencia, Venezuela, incluyendo datos socio-demográficos, antropométricos, anemia, deficiencia de VA (citología de impresión conjuntival (CIC) y retinol sérico), y consumo alimentario. El 92% de niños vivía en pobreza; 12% presentó déficit antropométrico (peso/talla), 13% anemia, 9% deficiencia de VA según la CIC y 0,5% según retinol sérico ($<0,70\mu\text{mol/L}$) y 30% a riesgo de deficiencia de VA (0,70-1,05mmol/L). Del total de los individuos, 17%, 37% y 5% tenían una ingesta insuficiente ($<80\%$ de las recomendaciones) de energía, hierro y VA, respectivamente. Al excluir del análisis el contenido de hierro y VA del enriquecimiento de la harina de maíz, se añade 38% y 10% de sujetos con deficiencia de ingesta respectiva a cada nutriente. Según el indicador peso/talla, la ingesta de hierro fue significativamente menor en desnutridos ($p<0,05$) que en normales y con sobrepeso, no siendo así para VA. Se concluye que el enriquecimiento con hierro contribuyó a mejorar el aporte de este nutriente en la dieta de los niños pero es aún insuficiente, y que la adición de VA no parece hacer diferencia dentro de la dieta en esta edad.

Palabras clave: Venezuela, harina de maíz, enriquecimiento, preescolares, consumo alimentario, hierro dietario; vitamina A dietaria, antropometría, desnutrición.

SUMMARY. Corn flour intake and its contribution of iron and vitamin A in low income preschoolers. The objective of this study was to determine whether the addition of iron and vitamin A (VA) to corn flour, supplied through a national enrichment program since 1993, allows preschoolers to achieve an adequate intake of these nutrients. Data from the assessment of 196 children (4-6 year old) from Valencia, Venezuela is presented, including socio-demographic, anthropometric, anemia, VA deficiency (by conjunctival impression cytology (CIC) and serum retinol), and food intake. 92% of the children lived in poverty. 12% were below the norm for weight-for-height, 13% had anemia, 9% had VA deficiency according to CIC, and 0.5% according to serum retinol ($<0.70\mu\text{mol/L}$), 30% were at risk of VA deficiency (0.70-1.05 mmol/L). 17%, 37%, and 5% of the sample had an insufficient intake ($<80\%$ of RDA) of energy, iron, and VA, respectively. When excluding from the analysis the amount of iron and VA from corn flour enrichment, an additional 38% and 10% of the sample showed deficient intakes of each nutrient, respectively. According to the weight-for-height indicator, iron intake was significantly lower in undernourished children ($p<0.05$) than in those normal or above the norm; this was not so for VA. It is concluded that iron enrichment contributes to the improvement of the intake of this nutrient but is not enough to provide an adequate amount of it; and that the addition of VA does not seem to have an important effect on the diet of this age group.

Key words: Venezuela, corn flour, enrichment, preschoolers, food intake, dietary Iron, dietary vitamin A, anthropometry, undernutrition.

INTRODUCCION

Las deficiencias de hierro y vitamina A (VA) causan estragos en toda la población, pero en especial en grupos vulnerables como son los niños en edad preescolar. Aún cuando los signos clínicos de las deficiencias no sean evidentes, pueden existir situaciones de riesgo por depleción de las reservas corporales que pueden identificarse evaluando la ingesta alimentaria de estos nutrientes.

El Banco Mundial reporta que cerca de un millón de personas en el mundo sufren de anemia clínica y que en los preescolares, el déficit de hierro, aún cuando se corrija, tiene repercusiones permanentes en la destreza manual, capacidad de concentración y de memoria (1).

La deficiencia de hierro en Latinoamérica y en la población venezolana ha sido ampliamente documentada, encontrándose a riesgo, principalmente mujeres embarazadas y niños pequeños (2-6).

La hipovitaminosis A ha sido descrita como problema de salud pública en países latinoamericanos (7-9). El papel de la VA en los trastornos oculares está bien establecido, sin embargo, investigaciones más recientes se enfocan en el papel protector de la VA contra las infecciones (10-16). En Venezuela, aún cuando la prevalencia de deficiencia de VA no es lo suficientemente elevada para causar alteraciones oculares (17), sí pudiera incidir sobre el elevado número de casos de infecciones respiratorias y diarreicas en los niños.

En la década de los 80 la disponibilidad en Venezuela de

alimentos como la carne, las verduras, las frutas, los cereales, las legumbres, y los tubérculos estuvieron por debajo de lo recomendado, tanto para hierro como para vitamina A (18,19). Este hecho unido a otros derivados de los cambios ocurridos en la economía venezolana durante las últimas décadas, así como el subsecuente deterioro del estado nutricional de la población, impulsaron al gobierno venezolano a emprender un programa alimentario de enriquecimiento a nivel nacional en 1993 (20-23). El vehículo escogido fue la harina de maíz precocida, usada principalmente en la elaboración de la arepa y que, además de ser un ingrediente culturalmente aceptado por todos los estratos de nuestra sociedad, goza desde hace muchos años de subsidios por parte del gobierno para mantener su bajo costo, lo cual la hace económicamente accesible a los grupos de menores recursos. Este producto se enriqueció con micronutrientes, entre ellos el hierro y la vitamina A, aumentando así la disponibilidad de estos elementos.

El objetivo del estudio fue evaluar si la adición de hierro y VA, suministrados a través de este programa, logra que los preescolares estudiados alcancen un consumo adecuado de los mismos, entendiéndose como consumo adecuado aquel igual o mayor al 80% de las recomendaciones para este grupo etario (24).

MÉTODOS

Esta investigación es de carácter descriptivo y está basada en datos de un estudio de tipo transversal. Este estudio se basó en la determinación del consumo de energía, vitamina A y hierro total del grupo y el patrón del consumo de la harina de maíz. Luego, con esta información se calculó la ingesta de estos nutrientes en condiciones hipotéticas de "no enriquecimiento de la harina de maíz", para estimar el aporte de hierro y vitamina A proveniente de la harina de maíz en la dieta de los preescolares. La muestra estuvo compuesta por 196 niños preescolares (4-6 años de edad), pertenecientes a un plantel educativo de una comunidad de bajos recursos en la zona norte de Valencia, Venezuela, en el año 1998. El tamaño muestral se calculó con base en la prevalencia de valores de déficit de vitamina A de la ciudad de Valencia (25). Los datos fueron recolectados durante el período septiembre-diciembre de 1998, previa aprobación de la comunidad educativa y autorización escrita de los representantes de los sujetos evaluados. Para la recolección de los datos se contó con personal profesional entrenado y estandarizado por el Centro de Investigaciones en Nutrición de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo (CEINUT) en diferentes protocolos establecidos. La información se recogió a través de entrevistas personales en los planteles y visitas a las viviendas de los sujetos, incluyendo:

Evaluación socio-demográfica del niño y del grupo familiar: Sexo, edad, estratificación social según el método de Graffar Méndez Castellano y composición familiar (26).

Evaluación nutricional antropométrica: Realizada mediante el uso de los indicadores de dimensión corporal, peso/talla (P/T) y talla/edad (T/E). El peso y la talla se tomaron siguiendo las normas del Programa Biológico Internacional (27). Se utilizó el estándar de referencia de crecimiento del National Center for Health Statistics (28).

Evaluación del estado de hierro y VA: Se tomaron 6 ml de sangre en ayunas, de una vena antecubital, se alicuotaron y procesaron. Se determinó hemoglobina (método automático—Automated Methods by Microcell Sysmex Counter F-500. Técnicas Médicas MAB.SA), y niveles de retinol sérico, por la técnica de *Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)*, según el método desarrollado por el International Vitamin A Consultative Group (29) y estandarizado en el laboratorio del CEINUT. Para las determinaciones de retinol sérico se utilizó un cromatógrafo líquido marca Hewlett-Packard modelo 1050. También se tomó una impresión de la conjuntiva ocular (CIC), para evaluar el estado de VA según metodología del International Center for Epidemiologic and Preventive Ophthalmology (ICEPO) (30). Los puntos de corte utilizados fueron: Para hemoglobina <11,5 g/dL (3). Para VA por CIC se consideraron los siguientes criterios de diagnóstico: *Normal:* Extendido laminar continuo de pequeñas células epiteliales, con abundante células caliciformes y puntos de mucina; *Anormal:* Muy pocas o ausencia de células caliciformes o puntos de mucina y un marcado agrandamiento de las células epiteliales que se presentan claramente separadas (30). Para VA por retinol sérico se consideró deficiencia a los valores <0,70mmol/L y a riesgo de deficiencia de retinol sérico aquellos ubicados entre 0,70-1,05mmol/L (31).

Evaluación de consumo alimentario: La información se recolectó mediante recordatorios de consumo de 24 horas (R24H) múltiples. Un equipo debidamente estandarizado en el método llevó a cabo la recolección de tres R24H no consecutivos, recogiéndose información incluso del fin de semana. Se utilizaron medidas prácticas caseras y formas geométricas graduadas como ayuda visual durante los recordatorios. La primera entrevista se llevó a cabo en el plantel educacional y las otras dos en los hogares de los sujetos. Debido a que esta muestra estuvo constituida por niños menores de 8 años, la información se obtuvo de sus madres o cuidadoras, sin embargo, siempre que fue posible se obtuvieron respuestas tanto del niño como de su representante para mayor precisión (32-34).

La información obtenida en los R24H fue llevada a

gramos de alimentos consumidos y se calculó el consumo total por persona, haciendo uso de los valores de energía y nutrientes de la tabla de composición de alimentos venezolana, excepto para los contados alimentos en que no se disponía de información nutricional, donde se utilizaron datos de la tabla de composición de alimentos americana (35, 36). De aquí se derivó información del patrón de consumo de la harina de maíz precocida, así como de la adecuación de la dieta, comparándolos con las recomendaciones venezolanas, ajustadas por edad y sexo (recomendación de hierro = 14 mg/día; de VA = 400 ER/día; de energía = varía entre 1360 y 1650 kcal/día, según la edad y el sexo) (24).

Las recomendaciones de energía y nutrientes para poblaciones se diseñan para incluir virtualmente a todos los individuos sanos por lo que se calcula un margen de seguridad en sus valores por encima del requerimiento de la mayoría de los individuos (igual al requerimiento promedio más dos desviaciones estándar). Esto llevaría a una sobreestimación de la prevalencia de inadecuación al calcular el porcentaje de adecuación de la dieta. Para reducir esta tendencia y tener una mejor apreciación de los individuos a riesgo por consumo inadecuado se tomó el 80% de las recomendaciones como punto de corte (37-40).

Estadísticas: Para la interpretación de los indicadores antropométricos (P/T y T/E) se utilizó el valor Z-Score, con el grupo de referencia. Para los cálculos del Z-Score, se utilizó el programa International Questionnaire Development System (41) y se tomaron los puntos de corte recomendados por la OMS (28): Sobre la norma = $Z \geq +1$, Normal = $-1,00 \leq Z < 1,00$, Bajo la Norma (Riesgo) = $-2,00 \leq Z < -1,00$ y Déficit = $Z < -2,00$. Para el análisis estadístico de los datos se usó el Statistical Package for the Social Sciences for Windows (42). Se realizaron pruebas estadísticas descriptivas (medias, desviaciones estándar, frecuencias, porcentajes), así como correlaciones y la prueba de Chi² para examinar asociaciones entre las variables sociales (edad, sexo, número de personas por viviendas, estrato social), el diagnóstico de anemia y el estado de VA con el consumo de hierro y VA. Se hicieron pruebas de t de Student en la comparación del consumo de hierro y VA entre los niños desnutridos y el resto del grupo.

RESULTADOS

La edad promedio del grupo estudiado fue de $5,1 \pm 0,8$ años, correspondiendo un 56% al sexo masculino y 44% al femenino. Según su estratificación socioeconómica, más del 90% de las familias de los niños estudiados viven en condiciones de pobreza (71,2% pobreza relativa; 20,4% pobreza crítica), lo cual concuerda con las características de la zona seleccionada para el estudio. Hubo un promedio de

$6,0 \pm 2,4$ (mediana=6,00; valores extremos=2, 7) personas por vivienda, de las cuales $3,2 \pm 1,7$ eran menores de 15 años (mediana=3,00; valores extremos=1, 7). En 21% de las viviendas cohabitan más de dos familias, siendo el 79% restante viviendas unifamiliares. No se encontraron asociaciones significativas entre estas variables y el consumo de energía y nutrientes.

La clasificación nutricional antropométrica del grupo estudiado, según los indicadores peso/talla (P/T) y talla/edad (T/E) se presenta en la Tabla 1. Se observa que con el indicador P/T, hubo un 11,7% bajo la norma (sólo 0,5% en déficit), mientras que con el indicador T/E hubo un total de 36,2% de niños bajo la norma.

TABLA 1

Diagnóstico nutricional antropométrico, según valores de Z-Score para los indicadores Peso/Talla y Talla/Edad, (n=196)

Clasificación	Peso/Talla		Talla/Edad	
	n	%	n	%
Sobre la norma ($Z \geq +1,00$)	19	9,7	9	4,6
Normal ($-1,00 \leq Z < 1,00$)	154	78,6	116	59,2
Riesgo ($-2,00 \leq Z < -1,00$)	22	11,2	54	27,5
Déficit ($Z < -2,00$)	1	0,5	17	8,7

Los análisis hematológicos mostraron que 13% de los niños eran anémicos. En cuanto al estado de VA, 9% tenían deficiencia según la CIC. Los niveles séricos de retinol mostraron que 0,5% de los niños se encontraban en déficit, mientras que 30% estaba "a riesgo de deficiencia" de la vitamina. Al buscar asociaciones entre estas variables y las de consumo los resultados no fueron significativos.

Con relación al patrón de consumo, se encontró que entre los diez alimentos más consumidos por los preescolares, la arepa ocupó el primer lugar con un 99,5% de frecuencia, mientras que el pan, su sustituto más frecuente, tuvo una frecuencia de consumo de 37% en esta muestra (Gráfico 1).

La Tabla 2 muestra los diez alimentos que mayor cantidad de hierro y VA proporcionan a la dieta típica de los preescolares estudiados, aportando la arepa cerca del 6% de estos nutrientes.

Aunque la harina de maíz fue consumida por el grupo en preparaciones diferentes a la arepa (empanadas: 10% y otras preparaciones: 4%), la arepa asada fue la forma más común de consumirla, con 195 niños (99,5%) que reportaron, en por lo menos uno de los recordatorios, haberla consumido. El tamaño promedio de la unidad de arepa fue de 90 g y la ingesta promedio diaria de 161 ± 71 g de este alimento, lo que suministra 293 ± 142 kcal, $4,1 \pm 1,95$ mg de hierro y 153 ± 74 ER de Vitamina A. El 76% de la muestra consumió

la arepa en sus hogares, 21% en la escuela, y 3% en otros sitios. La frecuencia de consumo de la arepa por comida fue la siguiente: desayuno: 35% de la muestra, merienda A.M.: 11%, almuerzo: 22%, merienda P.M.: 18% y el 60% en la cena.

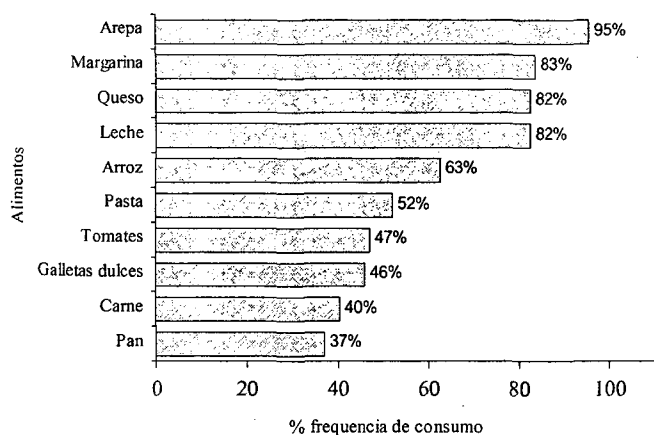
TABLA 2

Los diez alimentos consumidos con mayor aporte de hierro y vitamina A (n =196)

	Hierro % consumo total de hierro/día	Vitamina A % consumo total de VA/día
Caraota negra	12,7	Mango 19,8
Mortadela	8,7	Guayaba rosada 19,7
Pan blanco	8,3	Zanahoria 8,1
Lentejas	8,0	Plátano maduro 6,9
Arepa	5,8	Lechosa 6,2
Galleta dulce	4,5	Leche 6,2
Carne de res	3,7	Arepa 5,7
Galleta salada	3,7	Melón 5,3
Pasta	3,5	Huevo 4,3
Pollo	3,4	Queso blanco 3,0

GRAFICO 1

Los diez alimentos más consumidos por la muestra estudiada (n= 196)



El consumo promedio de energía fue 1531±359 kcal (mediana=1512 kcal, 96% de adecuación), mientras la ingesta media de hierro fue de 13,1±4,2 mg (mediana=12,4 mg, 93% de adecuación) y la de VA fue de 814±469 ER (mediana=744 ER, 204% de adecuación). En la Tabla 3 se refleja la distribución de la muestra considerada a riesgo (por debajo del 80% de las recomendaciones), según análisis del consumo total de alimentos y del obtenido omitiendo el aporte de la arepa, para energía, hierro y VA.

TABLA 3

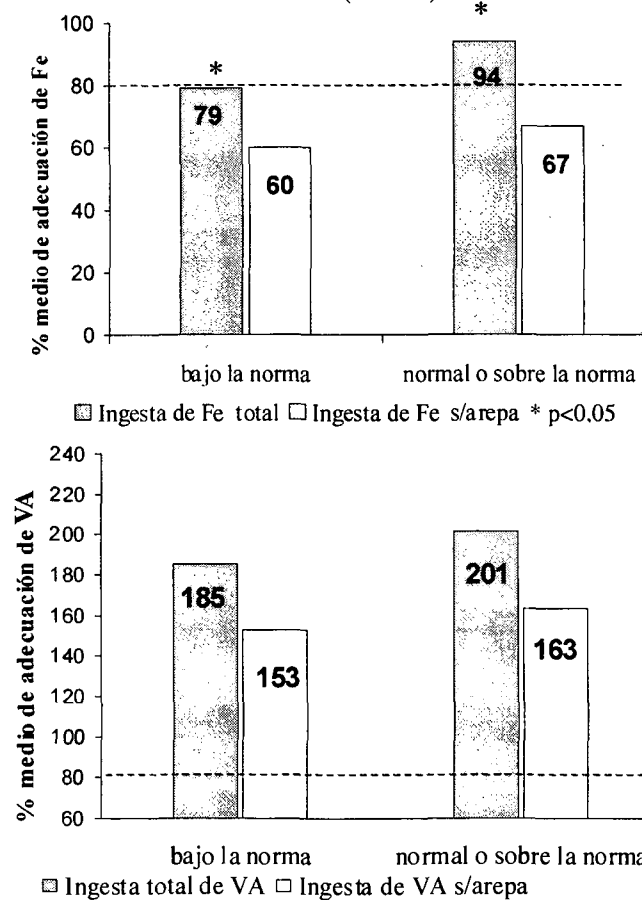
Distribución de la muestra considerada a riesgo por consumo deficiente (<80% de adecuación), para energía, hierro y vitamina A (n = 196)

Nutriente deficiente	Niños a riesgo por consumo			
	Ingesta total		Ingesta sin arepa	
	n	%	N	%
Energía (kcal)	33	17	107	55
Hierro (mg)	73	37	147	75
Vitamina A (ER)	10	5	30	15

A diferencia de las variables sociodemográficas, del diagnóstico de anemia y del estado de VA, donde no se encontraron asociaciones con las variables de consumo, al estudiar la muestra de acuerdo con su estado nutricional antropométrico, se vio que en los niños desnutridos, la fortificación con hierro no fue suficiente para cubrir sus necesidades, siendo su ingesta significativamente menor (p<0,05) que la de los niños normales y con sobrepeso (Gráfico 2).

GRAFICO 2

Adecuación de hierro y vitamina A, según el indicador Peso/Talla (n= 196)



Para evaluar cómo sería el consumo de Fe y VA sin el aporte adicional del enriquecimiento, se calculó la ingesta bajo la situación hipotética de "no enriquecimiento de la harina de maíz", utilizando para el análisis los datos de la Tabla de Composición de alimentos de 1991 (Fe=0,5 mg y ER=0) (43). Al analizar estos resultados se encontró que ninguno de los niños alcanzó a cubrir sus requerimientos de hierro, sin embargo no hubo diferencias significativas entre los sujetos en déficit y el resto del grupo.

En cuanto a la vitamina A, la adecuación fue excesiva y no hubo diferencia significativa del consumo de este micronutriente entre los niños en déficit y el resto del grupo, hallazgo que se mantuvo al eliminar de los cálculos el aporte de VA proveniente de la arepa.

DISCUSION

Las prevalencias encontradas con relación al déficit nutricional antropométrico ($Z < -2$ en P/T y T/E), se encuentran dentro del rango de baja prevalencia según la Organización Mundial de la Salud (28). No obstante, al utilizar el indicador T/E con relación al riesgo, se observa una afectación del crecimiento en talla de la muestra estudiada; dicha prevalencia se ubica sobre la referencia nacional (44) y sobre lo reportado por el Sistema de Vigilancia Alimentaria y Nutricional (SISVAN) para preescolares del estado Carabobo durante el año de 1998 (45). Sin embargo, la cantidad de niños en déficit ($Z < -2$) de este estudio es menor tanto para el indicador P/T (0,7 vs. 1,61 del SISVAN) como para T/E (8,7 vs. 15,7 del SISVAN). El 80% de los niños con déficit de talla en la muestra estudiada tuvieron un peso adecuado para su estatura, lo que pudiera reflejar el inicio a un proceso de adaptación.

La prevalencia de anemia encontrada en la muestra estudiada (13%) es similar a la reportada por FUNDACREDESA en niños de esta edad para el año 1998 (14,8% en varones y 11,9% en hembras) (23), cifra que según la Organización Mundial de la Salud, coloca a este grupo dentro de los parámetros de problema moderado de Salud Pública (46). Al comparar estos resultados con los datos de antropometría y de consumo, no se encontraron asociaciones significativas.

En cuanto al estado de VA, 9% tenían deficiencia según la CIC. Los niveles séricos de retinol mostraron que 0,5% de los niños se encontraban en déficit, mientras que 30% estaba "a riesgo de deficiencia" de este micronutriente. Las razones por la cual se obtuvieron distintas prevalencias de déficit según los indicadores CIC y niveles séricos de retinol, son principalmente debidas a las diferencias en la sensibilidad y especificidad de cada prueba en el diagnóstico del estado de vitamina A y a las limitaciones que presenta cada una de ellas. El retinol sérico, a pesar de no reflejar las reservas

hepáticas de vitamina A, es un indicador de mayor sensibilidad y especificidad que la CIC (31). También la diferencia en los resultados pudiera explicarse por el hecho de que estos indicadores miden distintos estadios de la deficiencia de vitamina A (47); razón por la cual los puntos de corte establecidos por la OMS para evaluar el déficit de vitamina A como problema de salud pública también difieren para cada indicador (31).

En relación al patrón de consumo de alimentos, el hecho de que la arepa sea consumida por el 99,5% de los preescolares evaluados y que está dentro de los 10 alimentos que más aportan hierro y vitamina A, habla a favor de la selección de la harina de maíz precocida como vehículo de estos micronutrientes. El perfil de enriquecimiento establecido suministra 25% de los requerimientos diarios de hierro y VA, a través de una ración de 80 g de harina de maíz precocida (aproximadamente 160 g de arepa) (21, 22). Los resultados indican que, en promedio, los niños consumieron alrededor de 160 g de arepa a lo largo del día, cubriendo la cuarta parte de sus requerimientos de estos nutrientes, lo cual coincide con lo recomendado por el programa de fortificación de las harinas. La arepa estuvo presente en todas las comidas del día, especialmente, en la cena donde un gran porcentaje de la muestra (60%) la consumió. No solamente la arepa es un alimento consumido por la totalidad de la muestra, sino que además las cantidades son altas, lo cual indica la gran aceptación de este producto.

En promedio, el grupo presentó un consumo de energía y hierro adecuado para su edad y sexo. El consumo de VA estuvo muy por encima de las recomendaciones (204%), aún cuando lo amplio de la desviación estándar indica que la ingesta de este micronutriente es muy variable entre los sujetos evaluados. Estos resultados del consumo de hierro y VA no difieren por mucho de otros reportados en niños venezolanos. El estudio de Battaglini y col. (48) realizado en una muestra de niños de estrato socioeconómico bajo y con diagnóstico de talla baja (por debajo del percentil 3 de los valores de referencia de la OMS), reporta adecuaciones de hierro y VA de $99 \pm 43\%$ y $170 \pm 98\%$ respectivamente para varones de 2 a 6 años y de $72 \pm 42\%$ y $142 \pm 78\%$ para las niñas de la misma edad. Igualmente, en el estudio realizado por Portillo (49) en 523 preescolares en pobreza extrema de la ciudad de Valencia Venezuela, se reporta una adecuación de consumo de hierro de $87 \pm 39\%$ y de VA de $148 \pm 126\%$ por día. Cabe destacar que el comportamiento alimentario de los preescolares estudiados por Portillo fue diferente al de esta muestra, ya que tenían un consumo de frutas mucho menor, aún así, reporta cifras elevadas de consumo de vitamina A.

Al analizar los datos según el punto de corte establecido (80% de adecuación), se observa que para energía y hierro, un porcentaje considerable de niños (17% y 37%

respectivamente) tuvo una ingesta deficiente, pudiendo considerárseles como "a riesgo". En cuanto a la vitamina A, el porcentaje de sujetos con consumo deficiente fue mucho menor (5%) y al evaluar las principales fuentes de VA de este grupo (tabla 2), se observa que las frutas, los vegetales y la leche proporcionan una cantidad mayor de VA que la arepa. Es de notar que, aún cuando el mango es una fruta de estación, en Venezuela se cosecha de mayo a septiembre y hay una segunda cosecha menor a fines de año (50), lo cual lo hace disponible durante un gran número de meses al año, lo que es especialmente cierto en la zona estudiada donde los árboles de dicha fruta están presentes en los patios de las casas y en los terrenos baldíos. Las otras fuentes vegetales de la tabla 2 se encuentran disponibles en el mercado durante todo el año.

El aporte de hierro y VA proveniente de la arepa fue de 29 y 38% respectivamente. Al observar la ingesta de hierro y VA excluyendo el aporte proveniente del enriquecimiento, se encontró que un 38% y un 10% de los niños cubrían sus necesidades de estos nutrientes respectivamente, gracias al enriquecimiento de la harina de maíz.

El estudio del impacto del enriquecimiento de las harinas con hierro y vitamina A en la población venezolana reportado por FUNDACREDESA concluyó que los preescolares anémicos resultaron con menor talla y peso que los no anémicos (23). En la muestra estudiada, aún cuando los niños con déficit de talla y peso no presentaron diferencias con el resto del grupo en cuanto a la prevalencia de anemia, su ingesta total de hierro sí fue significativamente menor (Gráfico 2). Esto, unido a que al estudiar los datos sin el aporte del hierro de la arepa ninguno de los niños alcanza las cantidades recomendadas, indica que para el grupo de niños normales y sobre la norma, una fuente muy importante, no solo de hierro, sino de energía proviene de la arepa.

El mismo análisis hecho para la VA, mostró que no hubo diferencias significativas de su consumo entre los niños en déficit y el resto del grupo, aún eliminando el aporte proveniente de la arepa, estando la adecuación siempre por encima de lo sugerido para este grupo de edad.

Los resultados de este estudio sugieren que el enriquecimiento férrico mejora el aporte de este nutriente en la dieta de los niños pero es aún insuficiente. Respecto a la adición con VA, esta no parece hacer diferencia dentro de la dieta de este grupo de edad. La arepa no es una de las fuentes más importantes de VA en la dieta de estos preescolares, mientras que las frutas y vegetales aportan cantidades mucho mayores del nutriente, no por tener una frecuencia de consumo mayor que la arepa, sino por tener una mayor concentración de VA por unidad de peso del alimento. A diferencia de otras poblaciones similares (49), en esta muestra los vegetales y especialmente las frutas son aceptadas tanto por las madres como por los niños. No obstante, los hallazgos del comportamiento de la VA en cuanto al mejoramiento de la

absorción del hierro (51), conjuntamente con el alto consumo de harina de maíz precocida en grupos de bajos recursos económicos, sugieren que su adición a este alimento, junto con el hierro, es de gran importancia en grupos a riesgo de deficiencia de estos micronutrientes, como son los preescolares. A pesar del elevado consumo de VA, un 5% de los niños estaba a riesgo por consumo deficiente del nutriente, 9% se encontraba en deficiencia según el indicador CIC y 30% tenían niveles séricos marginales. Las pobres condiciones sanitarias en que se encuentra esta comunidad, probablemente asociadas a la presencia de enfermedades infecciosas, pudieran incrementar las necesidades de este nutriente en el grupo. La deficiencia de hierro pudiera explicar en parte los bajos niveles de VA sérico ya que la relación entre la vitamina A y el hierro parece ser bidireccional, algunos estudios han demostrado que la deficiencia de hierro inhibe la movilización de las reservas hepáticas de retinol ocasionando una acumulación de vitamina A en el hígado y una disminución de los niveles plasmáticos de retinol. (52-54). Jang y col. en un estudio realizado en ratas, encontraron que la deficiencia de hierro afectaba la cinética de la vitamina A y demostraron que la velocidad de transferencia entre el pool hepático de retinil-ester y el retinol plasmático era más lenta en las ratas deficientes de hierro, concluyendo que la deficiencia de hierro inhibe la movilización de las reservas de vitamina A y puede disminuir la absorción de la vitamina A de la dieta (55).

Entre los factores no controlados por este estudio cabe mencionar las posibles pérdidas de VA por almacenamiento, procesamiento y métodos de cocción, lo cual pudiera repercutir en las prevalencias de deficiencia por CIC y retinol sérico.

La fortificación de alimentos para el control de deficiencias de micronutrientes es considerada un enfoque holístico que, junto con otras medidas gubernamentales para reducir la pobreza y mejorar la seguridad alimentaria, es más eficiente y sustentable que los programas enfocados en una población blanco específica, aún cuando sean más lentos en alcanzar las metas esperadas (56). La gran aceptación por parte de los niños estudiados, así como la disponibilidad del producto a precios asequibles, corroboran que la harina de maíz precocida es el vehículo ideal para el programa de enriquecimiento de harinas.

La información de consumo presentada aquí, pudiera servir como base para estimar la efectividad de las acciones tomadas en cuanto a la fortificación de la harina de maíz con vitamina A y su enriquecimiento con hierro. Las prevalencias de deficiencias de micronutrientes deben ser complementadas con información de consumo, factores económicos, culturales, sociales, así como de la situación de salud. Al planificar la recolección de nuevos datos, esto debe hacerse no solo tomando en cuenta el aspecto de la evaluación y el análisis de los mismos, sino las acciones a tomar al respecto.

REFERENCIAS

1. Banco Mundial de la Salud. Enriqueciendo la vida: Lucha contra la malnutrición por deficiencia de vitaminas y minerales en los países en desarrollo. 1ª edición. Washington D.C.: BMS; 1996.
2. Layrisse M, Martínez-Torres C, Mendez-Castellano H, Taylor P, Fossi M, Lopez-Blanco M, Landaeta-Jimenez M, Jaffe W, Leets I, Tropper E, Garcia-Casal MN y Ramirez J. Relationship between iron bioavailability from diets and the prevalence of iron deficiency. *Food Nutr Bull* 1990;12(4):301-309.
3. Taylor PG, Martínez-Torres C, Mendez-Castellano H, Bosch V, Leets I, Tropper E, Layrisse M. The relationship between iron deficiency and anemia in Venezuelan children. *Am J Clin Nutr* 1993;58(2):215-218.
4. Layrisse M, Chávez JF, Mendez-Castellano H, Bosch V, Tropper E, Bastardo B, González E. Early response to the effect of iron fortification in the Venezuelan population. *Am J Clin Nutr* 1996;64(6):903-907.
5. Freire WB. Strategies of the Pan American Health Organization/ World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin America. *Nutr Rev* 1997;55(6):183-8.
6. Darnton-Hill I, Mora JO, Weindtein H, Wilbur S, Nalubola PR. Iron and folate fortification in the Americas to prevent and control micronutrient malnutrition: an analysis. *Nutr Rev* 1999;57(1):25-31.
7. Mora JO, Dary O. Deficiencia de vitamina A y acciones para su prevención y control en América Latina y el Caribe, 1994. *Bol Oficina Sanit Panam*, 1994;117(6):519-529.
8. 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.
9. Mora JO, Gueri M, Mora OL. Vitamin A deficiency in Latin America and the Caribbean: an overview. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Pub Health*, 1998;4(3):178-185.
10. West KP. Dietary vitamin A deficiency: effects on growth, infection, and mortality. *Food Nutr Bul* 1991;13(2):119-131.
11. Ghana VAST Study Team. Vitamin A supplementation in northern Ghana: effects on clinic attendances, hospital admissions, and child mortality. *Lancet* 1993;342(8862):7-12.
12. Ramakrishnan U, Latham MC, Abel R, Frongillo E. Vitamin A supplementation and morbidity among preschool children in South India. *Am J Clin Nutr* 1995;61(6):1295-303.
13. Barreto M, Santos L, Assis A, Araújo M, Farenzena G, Santos P, Fiaccone RL. Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory-tract infections in young children in Brazil. *Lancet* 1994;344(8917):228-31.
14. Ross DA, Kirkwood BR, Binka FN, Arthur P, Dollimore N, Morris SS, Shier RP, Gyapong JO, Smith PG. Child morbidity and mortality following vitamin A supplementation in Ghana: time since dosing, number of doses, and time of year. *Am J Public Health* 1995;85(9):1246-1251.
15. Rahman MM, Mahalanabis D, Alvarez JO, Wahed MA, Islam MA, Habte D. Effect of early vitamin A supplementation on cell-mediated immunity in infants younger than 6 mo. *Am J Clin Nutr* 1997;65(1):144-148.
16. Nalubola R, Nestel P. The effect of vitamin A nutrition on health. A review. Washington DC: ILSI Press; 1999.
17. Hernández de Valera Y. Perfil nutricional de Venezuela. *An Venez Nutr* 1999;12(1):55-72.
18. Instituto Nacional de Nutrición/ULA. Hoja de balance de alimentos. Mérida: Talleres Gráficos U.L.A.; 1991.
19. López de Blanco M. El Pediatra ante el Hambre Oculta. *An Venez Nutr* 1999;12(2):129-136.
20. Jaffé W. Enriquecimiento de alimentos en una política alimentaria. En: Fundación Cavendes: Nutrición, base del desarrollo. Fascículo VI. Caracas: Ediciones Cavendes; 1995.
21. Instituto Nacional de Nutrición. Enriquecimiento de la harina de maíz precocida y de la harina de trigo en Venezuela. Una gestión con éxito. Publicación N°51, Serie Cuadernos Azules. Caracas: Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Instituto Nacional de Nutrición, Dirección Técnica-División de Investigaciones en Alimentos; 1995.
22. UNICEF/Instituto Nacional de Nutrición. El proceso de una experiencia exitosa, Enriquecimiento de la harina de maíz precocida y de la harina de trigo en Venezuela. Primera edición. Caracas: UNICEF; 1997.
23. Ministerio de la Secretaría/FUNDACREDESA. Estudio "Impacto del Enriquecimiento de las Harinas con Hierro y Vitamina A en la Población Venezolana". Caracas, 1998 (mimeo).
24. Fundación Cavendes/Instituto Nacional de Nutrición. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana. Versión preliminar. Caracas: Fundación Cavendes; 2000.
25. Solano L, Meertens L, Peña E, Arguello F. Deficiencias de micronutrientes. Situación actual. *An Venez Nutr* 1998;11(1):48-54.
26. Méndez-Castellano H. Sociedad y Estratificación. Método Graffar-Méndez Castellano. Caracas: FUNDACREDESA; 1994.
27. López de Blanco M, Landaeta M, editores. Manual de Crecimiento y Desarrollo. Caracas: FUNDACREDESA-Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría; 1991.
28. World Health Organization (WHO). Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry. WHO Technical Report Series 854. Geneva: WHO; 1995.
29. International Vitamin A Consultative Group (IVACG): Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status. Washington DC:IVACG; 1982.
30. Witppenn JR, West KP, Keenum D, Farazdaghi M, Humphrey J, Howard G, Sommer A. International Center for Epidemiologic and Preventive Ophthalmology training manual, Assessment of vitamin A status (ICEPO). Baltimore: The Johns Hopkins University; 1988.
31. WHO/NUT. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Micronutrient series 96.10; 1996.
32. Baranowski T, Domel SB. A cognitive model of children's reporting of food intake. *Am J Clin Nutr* 1994;59(1 Suppl):212S-217S.
33. Olinto M, Victora C, Barros F, Gigante D. Twenty-four-hour-recall overestimates the dietary intake of malnourished children. *J Nutr* 1995;125(4):880-884.

34. Sobo EJ, Rock CL, Neurhouser ML, Maciel TL, Neumark-Sztainer D. Caretaker-child interaction during children's 24-hour dietary recalls: who contributes what to the recall record? *J Am Diet Assoc* 2000;100(4):428-433.
35. Instituto Nacional de Nutrición. Tabla de composición de alimentos para uso práctico. Revisión 1999. Publicación N° 52, Caracas: Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Instituto Nacional de Nutrición; 1999.
36. United States Department of Agriculture (USDA). Composition of foods, raw, processed and prepared. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook No. 8. Washington DC:USDA; 1976.
37. Gibson RS. Evaluation of nutrient intake data. En: Principles of nutritional assessment, New York: Oxford University Press; 1990:137-152.
38. National Research Council, Subcommittee on Criteria for dietary evaluation. Nutrient requirements as basis for dietary evaluation. En: Nutrient adequacy, assessment using food consumption surveys. Fifth edition, Washington, DC: National Academy Press; 1992:10-16.
39. National Research Council (U.S.) Subcommittee on the tenth edition of the RDAs. Definitions and Applications. En: Recommended dietary allowances. Tenth edition, Washington, DC: National Research Council; 1989:10-23.
40. Mahan K, Arlin M. Lineamientos para la planeación de la dieta. En: Nutrición y dietoterapia. Mexico D.F.: Nueva Editorial Interamericana S.A.; 1995:277-294.
41. International Questionnaire Development System, version 5.01, Worldwide Information Systems. New Orleans; 1988.
42. Statistical Package for the Social Sciences for Windows, version 6.1.4, SPSS, Chicago; 1996.
43. Instituto Nacional de Nutrición. Tabla de composición de alimentos para uso práctico. Revisión 1991. Publicación N° 47, Caracas: Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Instituto Nacional de Nutrición; 1991.
44. FUNDACREDESA. Proyecto Venezuela, Tomo II. Caracas: FUNDACREDESA; 1995.
45. Instituto Nacional de Nutrición. Boletín informativo. Sistema de vigilancia alimentaria y nutricional, Caracas: Instituto Nacional de Nutrición; 1998.
46. WHO/UNICEF/UNU. Indicators and strategies for assessing iron deficiency and anemia programmes. Geneva: WHO; 1994.
47. International Vitamin A Consultative Group (IVACG): A brief guide to current methods of assessing vitamin A status. Washington DC:IVACG; 1993.
48. Battaglini S, Henríquez G, Aliendres O, Rached I, Arenas O. Talla baja: etiología y factores condicionantes en niños de una comunidad urbana marginal de Caracas. *An Venez Nutr* 2000;13(2):108-113.
49. 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 de Maestría]. Valencia: Universidad de Carabobo; 1999.
50. Velez Boza F, Valery de Velez G. Plantas alimenticias de Venezuela. Caracas: Fundación Bigott/Sociedad de Ciencias Naturales la Salle; 1990.
51. García-Casal MN, Layrisse M, Solano L, Barón M, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets. I, Tropper E. Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J Nutr* 1998;128(3):646-50.
52. Amine EK, Corey J, Hegsted DM, Hayes KC. Comparative hematology during deficiencies of iron and vitamin A in the rat. *J Nutr* 1970;100(9):1033-1040.
53. Staab DB, Hodges RE, Metcalf WK, Smith JL. Relationship between vitamin A and iron in the liver. *J Nutr* 1984;114(5):840-844.
54. Rosales FJ, Jang JT, Pinero DJ, Erickson KM, Beard JL, Ross AC. Iron deficiency in young rats alters the distribution of vitamin A between plasma and liver and between hepatic retinol and retinyl esters. *J Nutr* 1999;129(6):1223-1228.
55. Jang JT, Balmer J, Beard JL, Green M. Kinetic analysis shows that iron deficiency decreases liver vitamin A mobilization in rats. *J Nutr* 2000; 130(5):1291-1296.
56. Latham MC. Preventing specific micronutrient deficiencies. En: Latham MC. Human nutrition in the developing world. Rome: FAO; 1997.

Recibido:12-06-2001

Aceptado:22-04-2002

Listeria monocytogenes en vegetales mínimamente procesados

María Luisa de Curtis, Olgamar Franceschi y Norma De Castro

Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Caracas- Venezuela

RESUMEN. La demanda de vegetales mínimamente procesados se ha incrementado debido en parte al auge de los servicios de comida, donde las ensaladas siempre están incluidas en los menús diarios. Las nuevas técnicas de procesamiento y envase que permiten utilizar el producto listo para servir, han aumentado el riesgo asociado con microorganismos patógenos emergentes, tales como *Listeria monocytogenes*. En el presente trabajo se determinó la presencia de esta especie en 120 muestras de vegetales con procesamiento mínimo (ready-to-use), utilizados en servicios masivos de comida, y adicionalmente, se evaluó la calidad microbiológica a través de la numeración de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, e investigación de la presencia de *Shigella* spp y *Vibrio cholerae*. Para la investigación y detección de *L. monocytogenes* se utilizó la técnica TECRA® UNIQUE™ LISTERIA, el sistema BCM® *Listeria monocytogenes*, el sistema API LISTERIA y los métodos de detección moleculares AccuProbe™ y GENE-TRAK®. *E. coli* se detectó en aproximadamente el 30,3% de los vegetales usados en este estudio. El género *Listeria*, se evidenció en el 25% de las muestras en estudio: 30% correspondió a *L. monocytogenes*. Estos resultados permiten reafirmar la importancia del control microbiológico de los vegetales para el aseguramiento de la calidad de los mismos.

Palabras clave: Calidad microbiológica, alimentos, vegetales mínimamente procesados, *Listeria monocytogenes*.

SUMMARY. *Listeria monocytogenes* in vegetables minimally processed ready-to-use. The demand of vegetables minimally processed (ready-to-use) has increased partly due to the frequent use of the food services, where the salads are always included in the daily menus. The use of new technologies for processing and packaging has made possible to obtain a product ready to serve. Nevertheless the associated risk of the presence of emergent pathogens, such as *Listeria monocytogenes* seems to be involved. The aim of this work was to assess the microbiological quality of this kind of food. 120 samples of vegetables minimally processed ready-to-use were analyzed for their content of aerobic mesophilic bacteria, total and fecal coliforms and *E. coli*, and the presence of *Shigella* spp, *Vibrio cholerae* and *Listeria monocytogenes*. The TECRA® UNIQUE™ LISTERIA, the BCM® *Listeria monocytogenes* and the API LISTERIA systems, and the methods of molecular detection AccuProbe™ and GENE-TRAK® were used for isolation and identification. *E. coli* was detected in approximately 30,3% of the vegetables used in this study. The genus *Listeria* was evidenced in 25% of the samples; 30% corresponded to *L. monocytogenes*. *Shigella* spp and *Vibrio cholerae* were not isolated. The findings of this study suggest the need of the microbiological control of the vegetables minimally processed ready-to-use to assure their quality and safety.

Key words: Microbiological control, vegetables minimally processed, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCION

A pesar de que el desarrollo tecnológico ha permitido extender la vida útil de los productos refrigerados como los vegetales enteros, procesados, pre-cortados, ensaladas preparadas, frutas y vegetales de larga duración, ha hecho surgir la preocupación con relación a que en estos nuevos tipos de presentación de productos, aumente el peligro microbiológico asociado con patógenos emergentes. Tal es el caso de algunas especies del género *Listeria*.

El género *Listeria* comprende seis especies, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*; la presencia de cualquier especie se considera como indicador de una higiene deficiente (1). La *Listeria monocytogenes*, produce una enfermedad conocida como Listeriosis, de allí que existe un gran interés en excluir a este microorganismo de la cadena de producción de

alimentos, mientras sea posible, y mantener las condiciones que inhiban su multiplicación en los alimentos en que pueda multiplicarse. En infecciones severas se observa septicemia, meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central y posiblemente muerte; estos síntomas pueden ser precedidos por síntomas gastrointestinales tales como náuseas, vómito, diarrea, fiebre o dolor de cabeza (2). Esto es más significativo en grupos comprometidos, como ancianos, mujeres embarazadas, pacientes inmunocomprometidos y pacientes VIH positivos (3).

La *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo, produce β -hemólisis en agar sangre de diversos animales, oxidasa negativo, crece entre 2,5 y 42°C, motilidad positiva (20-25°C) tipo "tumbling" (4). Está presente comúnmente en aguas de desecho, fluviales, afluentes y hasta en plantas de tratamiento de aguas servidas, en el suelo, en el ambiente; en aves, pescado.

moluscos, crustáceos, insectos, leche, productos cárnicos, frutas y vegetales. Específicamente en estos últimos, ha sido aislada a partir de repollo, apio (celery), perejil, lechuga y jugo de lechuga, pepino, rábano, hongo, cebollín, y pimentón (5,6,7). Se ha encontrado en vegetales que están contaminados con la tierra o el estiércol usado como fertilizante. Puede sobrevivir por largos períodos en los alimentos, en las plantas de procesamiento y en ambientes refrigerados por lo que puede ser transmitida al humano a través de la ingestión de alimentos que se contaminan durante cualquier paso de la cadena de producción (8).

Entre los años 80 y 90, la presencia de la *Listeria monocytogenes* se comenzó a considerar como un problema de salud pública en los Estados Unidos, Canadá y algunos países de Europa como lo señalan Ho y col. (9) y Farber y Peterkin (10), quienes describen brotes importantes de Listeriosis que se identificaron en Europa y Norte América. Ciertas Agencias Reguladoras de diferentes países (11,12), han adoptado estándares en relación con *Listeria monocytogenes* en productos específicos listos para comer. En Venezuela, no está disponible ninguna información epidemiológica de Listeriosis pero hay reportes sobre vegetales frescos en los que se ha encontrado *Listeria monocytogenes* (13-15).

La demanda de vegetales crudos mínimamente procesados se ha incrementado debido en gran parte al auge de los servicios de comida, donde las ensaladas forman parte de los menús diarios y como se señaló anteriormente, las nuevas técnicas de procesamiento y envase que permiten el uso de vegetales listos para servir, han aumentado el riesgo asociado con *Listeria monocytogenes*.

Actualmente en Venezuela no existen datos recientes publicados de la calidad microbiológica de vegetales listos para servir, razón por la cual el objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de *Listeria monocytogenes* en mezclas de vegetales con procesamiento mínimo (ready-to-use), utilizados en servicios masivos de comida, y adicionalmente, evaluar su calidad microbiológica a través de la numeración de bacterias aerobias mesófilas, recuento de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, e investigación de la presencia de *Shigella* spp y *Vibrio cholerae*.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Se analizó por quintuplicado, un total de 120 muestras de vegetales mínimamente procesados, en envases de tamaño institucional (1 kg), seleccionadas antes de la fecha de vencimiento del producto, procedentes de los servicios de comida, constituidas por 50 muestras de lechuga picada (tipo americana), 50 de una mezcla de repollo morado, repollo

blanco y zanahoria y 20 de una mezcla de lechuga (tipo americana), zanahoria y repollo morado.

Numeración de aerobios mesófilos

Se prepararon las muestras de acuerdo a la Norma Venezolana COVENIN 1126-89 (16). Para el recuento se siguieron dos técnicas: la descrita en las Normas Venezolanas COVENIN 902-87 (17) utilizando placas con agar para recuento y la descrita en la Norma Venezolana COVENIN 3338-1997 (18) utilizando placas específicas Petrifilm™ (St. Paul MN). Los resultados de los recuentos se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

Determinación del Número Más Probable (NMP) de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*

Se siguieron las técnicas descritas en las Normas Venezolanas COVENIN 1126-89 (16) y 1104:1996 (19) con el caldo lauril sulfato triptosa (Difco®, Detroit MI) para tres tubos. Los coliformes totales se confirmaron en agar Levine (Difco®, Detroit MI) y los fecales en caldo para enriquecimiento de coliformes (EC Difco®, Detroit MI). El aislamiento de *E. coli* se realizó a partir de los tubos positivos de caldo EC, en agar Levine (Difco®, Detroit MI). Los resultados se expresan como NMP por gramo de muestra.

Investigación de *Shigella* spp

Se siguió la técnica descrita en el Bacteriological Analytical Manual, de la Administración de Alimentos y Drogas (20). Se identificó por pruebas convencionales: fermentación de glucosa y lactosa, motilidad y prueba de lisina decarboxilasa y por el sistema API 20E.

Investigación de *Vibrio cholerae*

Se siguió la técnica del Manual de Procedimientos Analíticos y Medidas Sanitarias Especiales, en prevención a la entrada del cólera en Venezuela (21). Se identificó mediante las pruebas bioquímicas correspondientes: agar triple azúcar hierro (TSI Difco® Detroit MI), metabolismo oxidativo o fermentativo (Hugh y Leifson), descarboxilación de la lisina, arginina y ornitina, oxidasa (Difco®, Detroit MI), y pruebas serológicas con el antisuero polivalente O para *V. cholerae* (Difco®, Detroit MI).

Investigación del género *Listeria* y *Listeria monocytogenes*

Se procesaron las muestras según la técnica descrita en el Bacteriological Analytical Manual de la Administración de Alimentos y Drogas (20), usando caldo tamponado de enriquecimiento para *Listeria* (BLEB). Se aisló en placas de agar Palcam (Merck®, Darmstadt Alemania) y se incubó por 48 horas a 30°C. Adicionalmente se utilizó el sistema de detección BCM® *Listeria monocytogenes* (Biosynth®,

Naperville IL). Paralelamente, a partir del caldo de enriquecimiento tamponado BLEB (Difco®, Detroit MI) se realizó la prueba TECRA® UNIQUE™ LISTERIA para la detección del género *Listeria*.

Identificación del género *Listeria* y *Listeria monocytogenes*

A las colonias características del género *Listeria* (verde gris con halo negro-marrón), provenientes del agar Palcam, se les realizó coloración de Gram y se determinó la movilidad (medio SIM Difco®, Detroit MI). También se utilizó la Iluminación de Henry, sembrando en agar soya caseína y observando mediante el método de Iluminación oblicua de Henry (22), utilizando un Illuminator Baush & Lomb Nicholas. Adicionalmente se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas para su identificación: prueba de la catalasa, fermentación de ramnosa, xilosa y manitol en caldo púrpura bromo cresol al 0,5% y se aplicó el sistema API LISTERIA.

La actividad hemolítica fue determinada mediante punción en placas de agar sangre base Columbia (Difco®, Detroit MI), con sangre de carnero al 5%, incubadas a 37°C por 24-48 horas. Se realizó la prueba de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson test), de acuerdo a la técnica descrita en el Bacteriological Analytical Manual de la Administración de Alimentos y Drogas (20), utilizando un cultivo de *S. aureus* hemolítico ATCC 25923 y uno de *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

Se utilizaron los métodos de detección e identificación moleculares para *L. monocytogenes*: GENE-TRAK® y AccuProbe™, utilizando como control positivo *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 y como control negativo *Listeria grayi* ATCC 19120.

Cepas de referencia

Shigella dysenteriae y *Vibrio cholerae* (Cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la U.C.V.), *E. coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 43256, *Listeria monocytogenes* LM82 (FDA), *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria grayi* ATCC 19120, *S. aureus* hemolítico ATCC 25923, *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó utilizando los promedios; la significación se determinó mediante la prueba chi cuadrado (χ^2) utilizando el valor de $p < 0,05$ como límite de la significación. Se utilizó el análisis de regresión en los recuentos de aerobios mesófilos, para calcular los coeficientes de correlación.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la distribución porcentual de las

muestras de vegetales mínimamente procesados según los rangos de contaminación con bacterias aerobias mesófilas; solamente en las muestras de lechuga picada se encontró el 5,0% por encima de 10^4 UFC/g.

TABLA 1

Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados según rangos de contaminación con bacterias aerobias mesófilas (UFC/g)

Vegetales procesados	< 10^3 UFC/g %	10^3 - 10^4 UFC/g %	> 10^4 UFC/g %
Lechuga picada	30,8	64,2	5,0
MRbRmZ	17,5	82,5	—
MLZRm	18,3	81,7	—

MRbRmZ: Mezcla de repollo blanco, repollo morado y zanahoria
MLZRm: Mezcla de lechuga, zanahoria y repollo morado n= 120

En las Tablas 2 a 4 se muestran las distribuciones porcentuales de las muestras de vegetales procesados según rangos de contaminación con coliformes. Si se considera como rango de aceptabilidad para *E. coli* = 3 NMP/g, un 69,66% de las muestras está fuera de los límites; si el punto de corte es =150 NMP/g, *E. coli* se detectó en aproximadamente el 30,3% de los vegetales usados en este estudio. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las muestras de vegetales procesados. En ninguna de las muestras analizadas se detectó *Shigella* spp ni *V. cholerae*.

TABLA 2

Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados (Lechuga picada) según rangos de contaminación con coliformes (NMP/gramo)

Rangos de contaminación (NMP/g)	Coliformes totales %	Coliformes fecales %	<i>E. coli</i> %
≤ 3	6,0	42,0	42,0
3-93	36,0	26,0	26,0
150-240	26,0	10,0	10,0
460-1100	—	14,0	14,0
≥ 1100	32,0	8,0	8,0

n=50 ; NMP/g: Número más probable/gramo

TABLA 3
Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados (Mezcla de repollo blanco, repollo morado y zanahoria) según rangos de contaminación con coliformes (NMP/gramo)

Rangos de contaminación (NMP/g)	Coliformes totales %	Coliformes fecales %	<i>E. coli</i> %
≤ 3	14,0	24,0	24,0
3-93	20,0	52,0	52,0
150-240	24,0	10,0	10,0
460-1100	16,0	10,0	10,0
≥ 1100	26,0	4,0	4,0

n=50 ; NMP/g: Número más probable/gramo

TABLA 4
Distribución porcentual de las muestras de vegetales mínimamente procesados (Mezcla de lechuga, zanahoria y repollo morado) según rangos de contaminación con coliformes (NMP/gramo)

Rangos de contaminación (NMP/g)	Coliformes totales %	Coliformes fecales %	<i>E. coli</i> %
≤ 3	—	25,0	25,0
3-93	25,0	40,0	40,0
150-240	20,0	25,0	25,0
460-1100	15,0	5,0	5,0
≥ 1100	40,0	5,0	5,0

n=20 ; NMP/g: Número más probable/gramo

Con relación al género *Listeria*, se evidenció su presencia en el 25% de las muestras en estudio, tanto por el método convencional (BLEB y Palcam), como por la técnica Mediante el Sistema de detección BCM® *Listeria monocytogenes*, aquellas colonias sospechosas de ser *L. monocytogenes*, dieron colonias color turquesa en el medio selectivo/diferencial BCM®. En el medio confirmatorio BCM® *Listeria monocytogenes* (LMCM), se observó la fluorescencia característica y produjeron ácido por fermentación de la ramnosa.

De acuerdo con la identificación de las colonias del género *Listeria* por el sistema API LISTERIA, el 30% de las colonias características provenientes del agar Palcam, correspondió a *L. monocytogenes*, el 36,5% a *L. innocua*, el 13,3% a *L. ivanovii*, el 10% a *L. welshimeri*, el 6,67% a *L. seeligeri* y el 3,33% a *L. grayi*.

L. monocytogenes y *L. seeligeri*, aumentaron la hemólisis producida por *S. aureus* hemolítico; *L. ivanovii* aumentó la

producida por *R. equi*. Todas las colonias fueron catalasa positiva y mostraron la motilidad tipo paraguas típica del género *Listeria* en el medio de movilidad (SIM). Mediante la iluminación de Henry, las colonias de *L. monocytogenes* se observaron con una tonalidad azul característica del género.

Estos resultados fueron confirmados por pruebas bioquímicas convencionales y actividad hemolítica, y se señalan en la Tabla 5. En dicha tabla se indican los códigos característicos de las diferentes especies de *Listeria*, que nos permitieron identificarlas por el sistema API LISTERIA. Así mismo se muestran los resultados obtenidos de los métodos de detección e identificación moleculares GENE-TRAK® y AccuProbe™. Con este último método los valores obtenidos fueron desde 342.765 hasta 364.330 RLU (Relative Light Units).

TABLA 5
Identificación del género *Listeria* con las pruebas bioquímicas convencionales, actividad hemolítica, los métodos de detección e identificación moleculares AccuProbe™ y GENE-TRAK® y el sistema API LISTERIA

<i>Listeria</i> spp	Resultados en						Código API
	β Hem	Ram	Xil	Man	AccP	G-T	
<i>Listeria monocytogenes</i> (N=9)	+	+	-	-	+	+	6510 6450 6010
<i>L. innocua</i> (N=11)	-	V	-	+	-	-	7510 7110
<i>L. ivanovii</i> (N=4)	++	-	+	-	-	-	3330 3340 3350 3330
<i>L. welshimeri</i> (N=3)	-	V	+	-	-	-	7710 7711
<i>L. seeligeri</i> (N=2)	+	-	+	-	-	-	3310
<i>L. grayi</i> (N=1)	-	V	-	+	-	-	7530 7530

β Hem: Beta hemólisis, Ram: Ramnosa, Xil: Xilosa, Man: Manitol, AccP: AccuProbe™ (sonda-ADN).
G-T: Gene-Trak® (sonda-ADN), Código API: Perfil numérico. V: variable.

DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos en relación con las bacterias aerobias mesófilas, se considera que los mismos indican que no hay una elevada contaminación y concuerdan

con algunos estudios realizados en este tipo de productos, donde se señalan variados rangos de poblaciones iniciales de bacterias aerobias mesófilas, desde 10^3 hasta 10^9 (23).

No se encontró diferencia significativa entre la metodología clásica y el uso del Petrifilm™ para el recuento de aerobios mesófilos ($r=0,98$); estos resultados concuerdan con los señalados por Ríos y col. (24).

Los resultados obtenidos por el método en placa con películas secas rehidratables, nos permiten concluir que son confiables para el tipo de alimento que se seleccionó para este estudio, y coinciden con los resultados obtenidos en estudios colaborativos realizados en el país (24,25).

En cuanto a *E. coli*, consideramos que deben mantenerse altos estándares de sanitización y temperaturas apropiadas de refrigeración durante el procesamiento, transporte y almacenamiento del tipo de vegetales estudiados. Ello es de suma importancia ya que estos productos son mínimamente procesados y se consumen crudos sin tratamiento térmico alguno (26).

En el presente estudio, el género *Listeria* fue detectado en las muestras de vegetales listos para servir, tanto por el método tradicional (agar Palcam) como por la técnica TECRA® UNIQUE™ LISTERIA, lo cual concuerda con los resultados señalados por Rijkelt (27), por lo que consideramos que dicha técnica, para vegetales mínimamente procesados como los utilizados en este trabajo, puede recomendarse por su economía de tiempo y la obtención de resultados confiables. Asimismo, los resultados obtenidos por el sistema API para la identificación de las diferentes especies del género *Listeria*, se pueden considerar confiables ya que fueron confirmados con los obtenidos por los métodos convencionales y en cuanto al sistema BCM® *Listeria monocytogenes*, consideramos que es una alternativa de los métodos tradicionales, ya que permite la detección e identificación de *L. monocytogenes* en alimentos, con exactitud, sensibilidad y precisión como lo señalan Rijkelt (27) y Restaino y col (28). Sin embargo, recomendamos realizar estudios colaborativos, para que sean aceptados por los organismos contralores y usados como métodos de rutina.

Los métodos utilizados en este trabajo. AccuProbe™ y GENE-TRAK®, constituyeron una herramienta valiosa para la identificación rápida de *L. monocytogenes* y nos permitieron confirmar los resultados obtenidos por los métodos convencionales y el sistema API.

Se puede concluir que la alta sensibilidad de los métodos de detección e identificación moleculares, podría afectar las especificaciones microbiológicas existentes; esto, sin ninguna duda, tendrá repercusión en los organismos contralores, en los fabricantes de alimentos y también en los consumidores (29).

El incremento en los últimos años, de brotes de Listeriosis y su asociación con el consumo de vegetales crudos, los cuales se han hecho populares en forma ya lista para servir en los

supermercados, en los autoservicios de ensaladas en los restaurantes, y como parte integral en la preparación de diversos tipos de sándwiches, ha estimulado la necesidad de un conocimiento general acerca de la presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos. Como señala Farber (2), los expertos internacionales que participaron en la reunión informal de trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre Listeriosis, llegaron a la conclusión de que no es posible la eliminación total de la *L. monocytogenes* de todos los alimentos; más bien el punto crítico no es cómo prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, sino cómo controlarla para minimizar sus niveles en los mismos. Las autoridades federales de los Estados Unidos, exhortan a la industria de alimentos a fin de que hagan el máximo esfuerzo en fabricar alimentos libres de *L. monocytogenes*, lo cual puede abarcar modificaciones de los equipos y los procesos, limpieza y sanitización más frecuentes de los equipos y ambientes, y mejorar los controles de temperatura (30,31). El objetivo de los organismos contralores es asegurar la toma de medidas prudentes, pero prácticas, para minimizar los posibles riesgos asociados con *L. monocytogenes* y recomendar la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (32). En los últimos años, el aumento de brotes causados por *L. monocytogenes* ha sido de gran importancia y preocupación para la salud pública y para la industria de alimentos, sobre todo dado que aún no se ha establecido la dosis infectiva de este microorganismo (33).

Tapia y Díaz (34) señalan que *L. monocytogenes* sobrevive y crece en lechuga fresca y preparada en la forma de un producto listo para servir. Farber y col. (35) realizaron un estudio en diferentes alimentos con la finalidad de detectar especies de *Listeria* y encontraron *L. monocytogenes* en 4 de 60 ensaladas preempacadas y en aproximadamente el 90% de las lechugas adquiridas al detal. Nuestros resultados señalan un 25% de muestras contaminadas con el género *Listeria* y 9% con *L. monocytogenes*, concordando con los obtenidos por Miranda (15), Brión (13) y Guevara (14); aún cuando *L. monocytogenes* esté inicialmente en bajos niveles en un producto contaminado, este microorganismo puede multiplicarse durante el almacenamiento, inclusive a temperaturas de refrigeración, ya que es psicotrófico. También es importante mantener las condiciones higiénicas y el control a través de la cadena alimentaria para continuar conservando nuestros productos en esos niveles, o lo que sería más deseable, libres de *L. monocytogenes*.

Por último, consideramos que los resultados de este trabajo contribuyen a establecer la situación en nuestro país, con relación a la presencia de la especie *L. monocytogenes* y recomendamos continuar con controles microbiológicos periódicos, dada la demanda cada vez mayor de los vegetales mínimamente procesados.

AGRADECIMIENTO

Las autoras agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) y al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela por el apoyo financiero de este trabajo.

REFERENCIAS

1. McLauchlin J. The identification of *Listeria* species. Int J Food Microbiol 1997; 38:77-81.
2. Farber, JM. What food companies should know about food-borne Listeriosis. 1992.
3. NACMCF. *Listeria monocytogenes*. National Advisory Commite on Microbiological Criteria for Food. Int J Food 1991; 14:185-246.
4. Brackett RE. Presence and persistence of *L. monocytogenes* in food and water. Food Technol 1988; 162:173-8.
5. Van Reuterghem B, Hysman F, Rygole R y Verstrate W. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in agricultural ecosystem. J Appl Bacteriol 1991; 71:211-17.
6. Ryu Ch, Igimi S, Inoue, S y Kumagai S. Incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. Intl J Food Microbiol 1992; 16:157-160.
7. Ortiz R. Incidencia de *Aeromonas* spp. y *Listeria* spp. en frutas y vegetales. Trabajo especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. 1993.
8. Loret J. Isolation and enumeration of *L. monocytogenes*. Food Technol 1988; 42:172-5.
9. Ho JL, Shands KN, Friedland G, Eckind P y Fraser DW. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch Inter Med 1986; 146:520-4
10. Farber JM y Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. Microbiol. Rev. 1991; 55:476-511.
11. Shank FR, Elliot EL, Wachsmuth IK y Losikoff ME. U.S. position on *Listeria monocytogenes* in foods. Food Control 1996; 7:229-34.
12. Skinner R. *Listeria*: UK Government's approach. Food Control 1996; 7:245-8.
13. Brión D. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales mínimamente procesados. Trabajo especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Ciencias y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. 1994.
14. Guevara LM. Ensaladas con mínimo procesamiento como sustrato para el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*. Trabajo especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. 1997.
15. Miranda LD, Ortiz E y Tapia M. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales de alto consumo en la región de Cojedes. Libro de Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos. Montevideo, Uruguay. 1992.
16. Norma Venezolana COVENIN 1126-89. Alimentos. Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1989.
17. Norma Venezolana COVENIN 902-87. Alimentos. Método para el Recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1987.
18. Norma Venezolana COVENIN 3338:1997. Alimentos. Recuento de Aerobios. Método en placas con películas secas rehidratables (Petrifilm). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1997.
19. Norma Venezolana COVENIN 1104:1996. Alimentos. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli*. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Publicación de FONDONORMA. Caracas, Venezuela. 1996
20. FDA. Food and Drug Administration BAM . Bacteriological Analytical Manual Arlington. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA. 1995.
21. Manual de procedimientos analíticos y medidas sanitarias especiales, en prevención a la entrada del cólera en Venezuela. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". División de Higiene de los Alimentos-MSAS. Venezuela. 1991.
22. Henry BS. Dissociation in the genus *Brucella*. J Infect Disease 1933; 52:374-402.
23. Carlin F y Nguyen-The C. Fate of *Listeria monocytogenes* on four types of minimally processed green salads. Lett Appl Microbiol 1993; 18:222-6.
24. Ríos M, Novoa ML, Borges R, Miró A, Estrada M, Trombino V y Rodríguez C. Comparación de recuentos obtenidos para aerobios mesófilos, mohos, levaduras y coliformes en alimentos utilizando métodos de cuantificación en placas, número más probable y películas secas rehidratables. Cartel presentado en el IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Primer Simposio Peruano de Conservación de los alimentos. Lima, Perú. 1991.
25. Ríos de Selgrad AM y Novoa ML. Apoyo del Departamento de Microbiología de Alimentos del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH "RR") a la investigación de las Enfermedades Transmitidas por alimentos (ETA). Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel" 1999; 30:8-13.
26. Odumeru JA, Mitchell SJ, Alves DM, Lynch JA, Yee AJ, Wang SL, et al. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. J Food Prot 1997; 60:954-60.
27. Rijkelt B. *Listeria monocytogenes*. Detection and behaviour in food and in the environment. pp 71-86. Thesis Landbouwniversiteit Wageningen. Holland.1997.

28. Restaino L, Frampton EW, Irbe RM. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Food Prot* 1999; 62:244-51.
29. Feng P. Impact of Molecular Biology on the Detection of Foodborne pathogens. *Molec Biotechnol* 1997; 7:267-78.
30. Farber JM, Wang SL, Cai Y y Zhang S. 1998. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. *J Food Prot* 1998; 61:192-5.
31. FDA. Food Safety and Inspection service and Food and drug administration. Preventing Foodborne Listeriosis. 1992.
32. ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Food. *Microorganisms in Foods 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality*. Blackwell Scientific Publications, London UK. 1988.
33. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition USDA/ Food Safety and Inspection Service Centers for Disease Control and Prevention. 2001.
34. Tapia MS y Díaz RV. Consideraciones ecológicas y de inocuidad alimentaria en productos de origen vegetal. *Arch Latinoamer Nutr* 1994; 44:232-41.
35. Farber JM, Sanders GW y Johnston MA. 1989. A survey of various food for the presence of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 1989; 52:453-8.

Recibido: 23-04-2001

Aceptado: 08-05-2002

FUNDACION BENGUA
para la Alimentación y Nutrición
CENTRO DE DOCUMENTACION

Propriedades funcionais de material colagenoso de pés de frango

Sandra Gerês Tavares Alves, Sandra Helena Prudencio-Ferreira

Centro de Ensino Superior de Maringá-CESUMAR. Universidade Estadual de Londrina-UEL,
Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos. Londrina, Paraná-Brasil

RESUMO. Material colagenoso foi obtido de peles e tendões desengordurados com éter etílico e tratados com soluções de NaCl 0,05M e NaCl 0,6M. Uma parte deste material foi seca a 35°C em estufa ventilada e a outra liofilizada. O conteúdo de colágeno no material seco a 35°C foi de 77,2g/100g e no liofilizado de 76,7g/100g. Os materiais desidratados apresentaram o mesmo comportamento de capacidade de formação de gel e retenção de água a frio. A capacidade emulsificante do material seco a 35°C foi superior a do liofilizado. O colágeno do material liofilizado apresentou maior solubilidade em água a 70°C e em ácido acético 0,5M. Força do gel, estabilidade da emulsão e retenção de água a 60°C foram maiores no material liofilizado. Os resultados indicam o potencial de uso destes materiais como ingrediente funcional em produtos cárneos.

Palavras chave: Propriedades funcionais, colágeno, frango.

SUMMARY. Functional properties of collagenous material from chicken feet. Collagenous material was obtained from chicken feet skins and tendons, defatted with ethylic ether and treated with 0.05M and 0.6M NaCl solutions. Part of the material was dried at 35°C in a forced air convection oven and another was freeze-dried. The air dried material had 77.2g/100g of collagen and the freeze-dried material 76.7g/100g. Both dehydrated materials showed the same behaviour for gel formation and cold water holding capacity. The material air dried had higher emulsifying capacity than the freeze-dried one. The collagen of freeze-dried material had higher solubility in 0.5M acetic acid and water at 70°C than air dried material. Gel strength, emulsion stability and water holding capacity at 60°C were higher for freeze-dried material. The results indicate the potential use of these materials as functional ingredients in meat products.

Key words: Functional properties, collagen, chicken.

INTRODUÇÃO

Além de seu tradicional uso industrial na produção de gelatina, o colágeno é pouco usado como um ingrediente funcional. Provavelmente o maior impedimento para o uso seja sua insolubilidade, então presume-se que tenha pouca atividade funcional (1).

Tecidos ricos em colágeno são importantes para estabilizar emulsões e fornecer propriedades texturais em hambúrgueres, lingüiças, salsichas e mortadelas. A molécula de colágeno é 60% hidrofóbica e durante o processamento de produtos cárneos em temperaturas de 60 a 65°C, as fibras colagenosas começam encolher, desnaturar e gelatinizam, tornando-se capazes de encapsular a gordura (2,3).

Tecidos conjuntivos de subprodutos cárneos podem ser um potencial agente ligante de água em produtos cárneos moídos com baixo teor de gordura. A conversão de tecido conjuntivo em gelatina por aquecimento, com subsequente adição de água, forma um gel que se incorporado a esses produtos pode melhorar o rendimento, textura e palatabilidade (4,5).

O aumento de consumo de produtos processados e com valor agregado de frangos gera um grande volume de componentes de carcassa sub-utilizados tais como, pele, coração, moela, pés e carne mecanicamente separada, que são

ricos em colágeno (6).

Há pouca informação sobre a utilização de tecido conjuntivo ou de colágeno desses componentes. A conversão do colágeno de pés de frango em gelatina foi estudada por Bobis & Greser (7,8) e Tawfeek (9,10). Bonifer et al. (11) e Osburn & Mandigo (5), demonstraram o uso potencial de pele na manufatura de produtos cárneos com baixo teor de gordura como agente ligante de água e modificador de textura.

Este trabalho teve como objetivos extrair material colagenoso de peles e tendões de pés de frango e determinar as propriedades de solubilidade do colágeno a quente e em meio ácido, capacidade de retenção de água a quente e a frio, capacidade de formação e força de gel, capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão dos materiais colagenosos seco a 35°C e liofilizado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do material colagenoso

Dois lotes de amostras de pés de frango foram obtidos em um frigorífico local. Os pés foram lavados em água corrente, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 50 ppm durante uma hora e enxaguados com água destilada. A pele e os tendões foram separados dos ossos com auxílio de

um bisturi, triturados e desengordurados com éter etílico. O material foi tratado com soluções de cloreto de sódio 0,05M e 0,6M (12), lavado exaustivamente com água destilada e centrifugado durante 30 minutos a 18.000 x g. Uma parte do precipitado foi liofilizada e a outra seca em estufa ventilada a 35°C. Os materiais foram triturados em um moinho tipo faca e classificados em malha de 0,59mm.

Composição centesimal

Os teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas foram determinados, conforme os métodos da AOAC (13). O fator de conversão usado para proteínas foi 5,36 (14). O conteúdo de colágeno foi determinado pela análise de hidroxiprolina (15). O fator 8,0 foi usado para converter o conteúdo de hidroxiprolina em colágeno.

Propriedades funcionais

A solubilidade do colágeno em ácido acético 0,5M foi determinada nas concentrações de 1:40 e 1:150 (p/v, amostra/solvente) de acordo com Montero et al. (16). A medida da solubilidade em água a 70°C foi realizada na concentração de 1:150 (p/v) e seguiu o método de Montero & Borderias (17). Os resultados foram expressos como porcentagem de colágeno solúvel em relação ao conteúdo de colágeno total na amostra.

A capacidade de retenção de água foi medida a frio e após aquecimento a 60°C, na concentração de 1:30 (p/v) pelo método descrito por Montero et al. (17). O resultado foi expresso como grama de água retida por grama de resíduo seco.

A capacidade de formação de gel foi avaliada segundo o método descrito por Montero & Borderias (17). As concentrações estudadas foram 1:30, 1:50, 1:100, 1:150, 1:180, 1:200 (p/v). A formação do gel foi verificada pela inversão do tubo de ensaio. A força do gel preparado na concentração de 1:30 foi medida por meio de um texturômetro (Stevens LFRA), onde um penetrômetro tipo TA 10 a 1mm/seg foi inserido 10 mm no gel. A força do gel foi expressa em Newton.

A capacidade emulsificante do colágeno solúvel em ácido acético 0,5M na concentração de 1:40 (p/v) foi avaliada pelo método descrito por Montero & Borderias (1). O resultado foi expresso como volume de óleo gasto por miligrama de colágeno solúvel. A estabilidade foi medida em uma emulsão preparada com 80% do volume de óleo gasto na medida da capacidade emulsificante utilizando o método de Yasumatsu et al. (18). O resultado foi expresso como a porcentagem de emulsão remanescente após aquecimento e centrifugação.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento com o material "in natura" seguiu o delineamento inteiramente ao acaso. Para os experimentos

com os materiais desidratados utilizou-se o delineamento de blocos casualizados, onde os processos de desidratação foram os tratamentos e os lotes foram os blocos. O esquema fatorial de tratamentos foi utilizado para as medidas de solubilidade do colágeno e capacidade de retenção de água. A significância dos resultados foi testada por análise de variância (ANOVA) por meio do teste F e aplicado o teste Tukey de comparação de médias, utilizando-se o programa estatístico SAS (19).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal de peles e tendões "in natura" dos dois lotes de amostras foi diferente quanto aos teores de proteínas, lipídeos e cinzas (Tabela 1), a obtenção manual do material pode ter causado a diferença.

TABELA 1
Composição química do material (peles e tendões de pés de frango) "in natura" (g/100g)*

Constituintes	Lote 1	Lote 2
Umidade	65,39a	63,52a
Proteínas** (b. s)	61,69b	64,11a
Lipídeos (b. s)	46,30a	39,78b
Cinzas (b. s)	0,71a	0,61b

* Valores médios de três determinações.

** Fator de conversão = 5,36.

b. s. = base seca.

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma linha, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

O rendimento de materiais colagenosos desidratados foi de cerca de 16% em relação ao peso de peles e tendões "in natura". Obtiveram-se materiais desidratados com alto conteúdo de colágeno. O processo de liofilização foi mais eficiente para retirada de água do material e resultou num produto com maior teor de lipídeos (Tabela 2).

Durante o processo de secagem, à medida que a água evapora ocorre diminuição do diâmetro dos poros e capilares do material, e conseqüentemente há um encolhimento do mesmo. O fluxo de água do interior do produto até a sua superfície, leva consigo os solutos não voláteis que se depositam sobre a mesma prejudicando a remoção de água do material, devido à formação de camadas duras e impermeáveis em sua superfície. No processo de liofilização esses fenômenos não ocorrem e o material mantém sua forma e tamanho originais, facilitando a remoção de água (20).

A solubilidade do colágeno, nas três condições avaliadas, foi menor para a amostra seca a 35°C. A medida em meio ácido na amostra liofilizada foi superior quando determinada

na concentração de 1:40, e não houve diferença entre os valores obtidos nas duas concentrações testadas na amostra seca a 35°C. Houve um aumento significativo da solubilidade quando as amostras foram aquecidas a 70°C em meio aquoso (Tabela 3).

TABELA 2

Composição química do material colagenoso seco a 35°C e liofilizado de pés de frango* (g/100g)

Constituintes	Material colagenoso	
	Seco a 35°C	Liofilizado
Umidade	15,06a	11,29b
Proteínas** (b. s)	86,35a	85,59a
Colágeno (b. s)	77,20a	76,68a
Lipídeos (b. s)	9,14b	9,78a
Cinzas (b. s)	0,61a	0,59a

* Valores médios de dois lotes, com três repetições cada um.

** Fator de conversão = 5,36.

b. s. = base seca.

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma linha, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 3

Solubilidade do colágeno presente no material seco a 35 °C e liofilizado de pés de frango*

Solubilidade**	Material colagenoso	
	Seco a 35°C	Liofilizado
Meio ácido (1:40)	3,31b B	6,45a B
Meio ácido (1:150)	2,20b B	4,00a C
Meio aquoso a 70 oC (1:150)	53,64b A	66,09a A

* Valores médios de dois lotes, com três repetições cada um.

** % de colágeno solúvel em relação ao conteúdo de colágeno total na amostra.

Médias acompanhadas, por letras minúsculas iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

Médias acompanhadas por letras maiúsculas iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

A amostra liofilizada apresentou capacidade de retenção de água superior a da amostra seca a 35°C na medida feita a 60°C. Os valores obtidos na avaliação realizada a 60°C foram superiores aos obtidos na medida a frio, tanto para o material seco a 35°C quanto para o liofilizado (Tabela 4). Estes resultados estão de acordo com os de Ranganayaki et al. (21), que observaram um aumento acentuado na hidratação do colágeno de couro bovino quando aquecido em meio aquoso.

TABELA 4

Capacidade de retenção de água do material colagenoso seco a 35 °C e liofilizado de pés de frango*

Capacidade de retenção de água **	Material colagenoso	
	Seco a 35 °C	Liofilizado
Frio	4,06a B	4,56a B
60 °C	27,74b A	30,02a A

* Valores médios de dois lotes, com três repetições cada um.

** g de água / g de resíduo seco.

Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

Médias acompanhadas por letras maiúsculas iguais, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

As diferenças na solubilidade e capacidade de retenção de água dos materiais podem ser, pelo menos em parte, o resultado de alterações sofridas na macroestrutura dos materiais durante a desidratação. As camadas duras formadas durante a desidratação pelo calor/ar são planas e não porosas prejudicando a reidratação do material. Enquanto que amostras liofilizadas apresentam estrutura tipo “caixa de abelha”, isto é, com poros abertos que facilitam a reidratação dos materiais (22).

Além dessas alterações na macroestrutura, a desidratação a 35°C pode ter provocado a desnaturação da molécula de colágeno. Com o desentrelaçamento da tripla hélice, a hidrofobicidade de superfície da molécula aumentou e favoreceu a agregação das cadeias modificadas, diminuindo a superfície de hidratação e a interação com a água e consequentemente a solubilidade. No processo de liofilização estas alterações estão minimizadas (23).

A maior porção de água retida é presa fisicamente, assim o encolhimento e possível agregação das moléculas de colágeno durante a secagem a 35°C provocou diminuição do espaçamento entre as cadeias polipeptídicas e colaborou para a menor capacidade de retenção de água.

Os materiais seco a 35°C e liofilizado apresentaram o mesmo comportamento de formação de gel até a concentração de 1:100 (Tabela 5). Quando o colágeno é aquecido em solução ocorre o encolhimento das suas fibrilas, havendo um desalinhamento das fibras e colapso do arranjo em tripla hélice das subunidades polipeptídicas na molécula de colágeno. Durante esse processo muitas ligações não covalentes, algumas ligações covalentes inter e intramoleculares (ligações cruzadas) e poucas ligações peptídicas são quebradas. Isso resulta na conversão da estrutura helicoidal do colágeno a uma forma mais amorfa, parcialmente desnaturada e mais solúvel. Ocorre o aumento da capacidade de retenção de água, que consequentemente levará à formação de gel (24).

TABELA 5

Capacidade de formação e força de gel do material colagenoso seco a 35 °C e liofilizado de pés de frango

Concentração	Material colagenoso			
	Seco a 35°C		Liofilizado	
	Formação	Força (N)*	Formação	Força (N)*
1:30	+	1,19b	+	1,32a
1:50	+	Nd	+	Nd
1:100	+	Nd	+	Nd
1:150	-		-	
1:180	-		-	
1:200	-		-	

+ = positivo para formação de gel. - = negativo para formação de gel.

* Valores médios de dois lotes, com três repetições cada um.

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma linha, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

Nd = não determinado

O gel obtido a partir do material liofilizado foi mais forte, pois esta amostra possuía colágeno mais solúvel a quente do que o colágeno do material seco a 35°C, apresentando maior concentração protéica em solução, havendo portanto a possibilidade de maior interação proteína-proteína durante o resfriamento com a formação de uma estrutura tridimensional responsável pelo gel mais resistente (Tabelas 3 e 5).

As propriedades emulsificantes foram avaliadas em relação à fração de colágeno solúvel em meio ácido. O material seco a 35°C, apresentou capacidade emulsificante maior que o material liofilizado (Tabela 6). O colágeno do material seco a 35°C por ser menos solúvel, estava presente em menor quantidade na alíquota utilizada para a medida, e provavelmente com as moléculas mais desdobradas e com poucas ligações intermoleculares, assim expondo as regiões hidrofóbicas e melhorando a capacidade emulsificante (1).

O colágeno do material colagenoso liofilizado sendo mais solúvel, estava presente em maior quantidade na alíquota usada para o teste, assim durante a formação da emulsão houve maior interação proteína-proteína resultando na formação de um filme interfacial mais coeso e viscoelástico que ofereceu maior estabilidade a emulsão (25).

Foi possível obter material colagenoso de pés de frango com elevado teor de colágeno. O material colagenoso liofilizado apresentou resultados superiores para as propriedades funcionais avaliadas com exceção das capacidades emulsificante, retenção de água a frio e de formação de gel. Os resultados indicam o potencial de material colagenoso de pés de frango como ingrediente funcional em produtos cárneos.

TABELA 6

Propriedades emulsificantes do material colagenoso seco a 35°C e liofilizado de pés de frango*

Propriedades emulsificantes	Material colagenoso	
	Seco a 35°C	Liofilizado
Capacidade emulsificante**	69,93a	30,96b
Estabilidade da emulsão***	87,30b	88,89a

* Valores médios de dois lotes, com três repetições cada um.

** mL de óleo gasto / mg de colágeno solúvel.

*** % de emulsão remanescente em relação à quantidade total da emulsão.

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma linha, não apresentam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS

1. Montero P, Borderias J. Emulsifying capacity of collagenous material from the muscle and skin of hake *Merluccius merluccius* L. and trout *Salmo irideus* Gibb: effect of pH and NaCl concentration. *Food Chem* 1991;41:251-67.
2. Bailey AJ, Light ND. Connective tissue in meat and meat products. London: Elsevier Applied Science, 1989.
3. Whiting RC. Contributions of collagen to the properties of comminuted and restructured meat products. In: *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference*. Chicago, 1989:149-55.
4. Osburn MW, Mandigo, RW, Eskridge KM. Pork Skin connective tissue gel utilization in reduced-fat bologna. *J Food Sci* 1997;62(6):1176-82.
5. Osburn MW, Mandigo RW. Reduced-fat bologna manufactured with poultry skin connective tissue gel. *Poultry Sci* 1998;77(10):1574-84.
6. Bonifer LB, Froning GW. Chicken skin composition as affected by aqueous washing. *J Food Sci* 1996; 61(5): 895-8.
7. Bobis L, Greser E. Commercial productions of poultry gelatin III. *Hydinarskky-Priemysel* 1982;24(7/8): 292-334.
8. Bobis L, Greser E. First pilot plant equipment for processing poultry legs into edible poultry gelatin. *Hydinarskky-Priemysel* 1983;25(9/10):385-92.
9. Tawfeek MS, Khalil, MK, Safurat MM. Chemical analysis and physical properties of gelatin and glue separated from chicken legs of poultry slaughter houses. In: *Proceedings of the Food Science Symposium*. Alexandria, 1992:113-6.
10. Tawfeek MS, Khalil MK, Safurat MM. Separation of gelatin and glue from chicken legs. In: *Proceedings of the Food Science Symposium*. Alexandria, 1992:100-12.
11. Bonifer LJ, Froning GW, Mandigo RW, Cuppett SL, Meagher MM. Textural, color, and sensory properties of bologna containing various levels of washed chicken skin. *Poultry Sci* 1996; 75(8):1047-1055.
12. Borderias AJ, Montero J. Changes in fish muscle collagen during frozen storage. In: Borderias AJ, Montero J. Storage lives of chilled and frozen fish products. *International Institute of Refrigeration: Aberdeen*. 1985: 85-91.

- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington: AOAC,1996.
- Johnston-Banks FA. Gelatine. In: Harris P, editor. Food Gels. London: Elsevier Applied Science, 1990.
- Woessner Jr JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. Arch Biochem Biophys 1961;93:440-47.
- Montero P, Colmenero JF, Borderias J. Effect of pH and presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. J Sci Food Agric 1991;54(1):137-46.
- Montero P, Borderias J. Gelification of collagenous material from muscle and skin of hake *Merluccius merluccius* L. and trout *Salmo irideus* Gibb according to variation in pH and the presence of NaCl in the medium. Z Lebensm Unters Forsch 1990;191:11-5.
- Yasumatsu K. et al. Whipping and emulsifying properties of soybean products. J. Agric. Biol. Chem 1972;36(5):719.
- SAS Institute. SAS User's Guide:Statistic. Cary, USA: SAS INST, 1996.
20. Aguilera JM, Stanley DW. Microstructural principles of food processing and engineering. New York: Elsevier Applied Science, 1990.
 21. Ranganayaki MD, Asghar A, Henrickson RL. Influence of anion and cation on the water-holding capacity of bovine hide collagen at different pH values. Effect of sodium chloride and polyphosphates on hydration. J Food Sci 1982;47(3):705-10.
 22. Cohen JS, Yang TCS. Progress in food dehydration. Trends in Food Sci & Technol 1995;6:20-4.
 23. Liaps AI, Bruttini R. Freeze drying. In: Mujumdar AS, Handbook of industrial drying, 2nd ed. New York: Marcel Dekker,1995:309-42.
 24. Foegeding EA, Lanier,TC, Hultin, HO. Characteristics of edible muscle tissues. In: Fennema OR, Food Chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker,1996:879-942.
 25. Damodaran S. Amino acids, peptides and proteins. In: Fennema OR, editor. Food Chemistry. 3rd ed. New York, Marcel Dekker, 1997:321-432.

Recibido:08-03-2001

Aceptado:05-06-2002

Adaptabilidad de mazorcas de híbridos de maíz super dulce al procesamiento industrial. I congelación

Braunier Alfonso, Candelario Camacho, Ligia Ortiz de Bertorelli y Frank De Venanzi

Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela- Delmonte Andina CA, Turmero. Edo Aragua, Venezuela

RESUMEN. Para evaluar la adaptabilidad de las mazorcas de los híbridos de maíz super dulce *sh2* Krispy king, Víctor y 324 a la congelación, 100 mazorcas de cada híbrido fueron congeladas a -18°C. A los 120 días del almacenamiento, las mazorcas fueron comparadas química, microbiológica y sensorialmente con un maíz dulce *su*. Además, fue determinado el rendimiento industrial en el proceso de congelación y el largo y número de hileras de las mazorcas. Los resultados revelaron rendimientos superiores al 60% en mazorcas congeladas. Las mazorcas presentaron un largo y un número de hileras aceptable. Las características químicas de los híbridos super dulces no difirieron de las del maíz dulce a un nivel de significación del 5%, con excepción de la humedad y de los sólidos solubles del cultivar Víctor y los azúcares totales del híbrido 324, cuyos valores fueron estadísticamente diferentes y el pH que fue mas alto en todos los maíces *sh2*. Durante la congelación disminuyeron los sólidos solubles, los azúcares y la acidez, mientras que el pH aumentó. Las mazorcas congeladas presentaron un rango microbiológico admisible, con baja actividad de mesófilos y coliformes totales, ausencia de psicrófilos y coliformes fecales y una apreciable cantidad de hongos. En conclusión los híbridos de maíz *sh2* se adaptaron satisfactoriamente a la congelación, resaltando su baja cantidad de sólidos solubles y alto contenido de azúcares totales, el cual casi duplicó al del maíz *su*. Además, el sabor, textura, dulzor y apariencia de los granos fueron mejores, destacándose el híbrido Víctor por su rendimiento y características sensoriales, siendo preferido por el panel evaluador.

Palabras clave: Maíz *sh2*, congelación, características.

SUMMARY. Super sweet corn adaptability for industrial freezing process. With the purpose of evaluating adaptability to the freezing process of super sweet corn *sh2* hybrids Krispy King, Victor and 324, 100 cobs of each type were frozen at -18°C. After 120 days of storage, their chemical, microbiological and sensorial characteristics were compared with a sweet corn *su*. Industrial quality of the process of freezing and length and number of rows in cobs were also determined. Results revealed yields above 60% in frozen cobs. Length and number of rows in cobs were acceptable. Most of the chemical characteristics of super sweet hybrids were not different from the sweet corn assayed at the 5% significance level. Moisture content and soluble solids of hybrid Victor, as well as total sugars of hybrid 324 were statistically different. All *sh2* cobs had higher pH values. During freezing, soluble solids concentration, sugars and acids decreased whereas pH increased. Frozen cobs exhibited acceptable microbiological rank, with low activities of mesophiles and total coliforms, absence of psychrophiles and fecal coliforms, and an appreciable amount of molds. In conclusion, *sh2* hybrids adapted with no problems to the freezing process, they had lower contents of soluble solids and higher contents of total sugars, which almost doubled the amount of *su* corn; flavor, texture, sweetness and appearance of kernels were also better. Hybrid Victor was preferred by the evaluating panel and had an outstanding performance due to its yield and sensorial characteristics.

Keys words: Corn *sh2*, freezing, characteristics.

INTRODUCCION

Existen muchas mutaciones en el maíz que ocasionan variaciones en las características del endospermo. Algunos genes pueden causar alteraciones en el tipo y cantidad de carbohidratos durante la maduración del grano. Entre ellos, el gen *su* produce un aumento de los polisacáridos solubles en agua, como el fitoglicógeno y disminuye la síntesis del almidón (1,2). En tanto que el gen *sh2* no sintetiza la enzima ADP-glucosa fosforilasa, clave en la síntesis del almidón y causa una acumulación de sacarosa y de lípidos en lugar de polisacáridos solubles y almidón (3,4). De manera que estos maíces poseen cuatro a ocho veces más azúcares que los

híbridos no mutantes y son conocidos como super dulces (4). Este nuevo maíz, denominado Shrunken-2, supera al maíz dulce *su* por presentar características mejores como: un contenido mas alto de azúcares en la madurez con dos a tres veces mas sacarosa (4), un período de cosecha más largo (5), una textura suave y crujiente, no requerir adición de azúcar al procesarlo (6), presentar rendimientos comparables al de los cultivares *su* (7) y ser preferido por los consumidores en las pruebas de sabor (8), por lo cual es muy cotizado en diversos países.

En Venezuela, el cultivo de maíz super dulce está siendo introducido con amplias expectativas en la búsqueda de nuevas alternativas, tanto para la industria como para los

productores agrícolas, de forma que actualmente hay un marcado interés nacional por evaluar el comportamiento industrial de algunos híbridos de maíz *sh2* a cultivarse comercialmente en el país, por lo cual el objetivo de esta investigación consistió en estudiar la adaptabilidad de tres híbridos de maíz super dulce del grupo genético *sh2* al procesamiento como mazorca congelada.

MATERIALES Y METODOS

Selección del material

Los híbridos de maíz super dulce, grupo genético *sh2*, seleccionados fueron: Krispy king, Víctor y 324 y del maíz dulce, grupo genético *su*, el híbrido Bonanza (XZ).

Siembra, practicas agronómicas y cosecha

La siembra se llevó a cabo en una parcela agrícola de San Joaquín, estado Carabobo, en un área de 1.250m². De cada híbrido fueron sembradas 2½ hileras, separadas 0,7m entre sí con 5 plantas/m. La cosecha fue hecha manualmente y el muestreo fue realizado al azar.

Congelación de las mazorcas de maíz

Para la congelación de las mazorcas se aplicó el esquema tecnológico presentado en la Figura 1, el cual consistió de las siguientes etapas:

Recepción: El maíz en mazorcas fue recibido en cestas plásticas transportadas por un camión que fue pesado en una romana.

Deshojado: Se realizó mecánicamente, pasando la mazorca por una mesa vibratoria y luego por un canal formado por dos rodillos que giran en sentido contrario y quitan las hojas y barbas.

Lavado: Las mazorcas peladas fueron transportadas por una banda metálica a un túnel con aspersores de agua a presión para remover las impurezas.

Selección: Se llevó a cabo en una mesa con bandas plásticas que giran en sentido contrario, siendo seleccionadas las mazorcas libres de ataques de hongos y enfermedades, de tamaño uniforme y desarrollo homogéneo.

Corte: A las mazorcas se les cortaron los extremos para llevarlas a un tamaño estándar de 15 ± 1cm.

Escaldado: Las mazorcas fueron colocadas verticalmente en cestas plásticas y trasladadas hasta el sistema de escaldado para ser sometidas a un tratamiento térmico con vapor de agua a 90°C por 10min.

Enfriamiento: Se realizó con agua clorinada hasta alcanzar una temperatura máxima de 18°C en el centro térmico. Seguidamente las mazorcas fueron colocadas en una cava de enfriamiento a 5°C por 3 horas.

Inspección: Una vez enfriadas y escurridas, las mazorcas fueron trasladadas a la sala de congelación, donde fueron

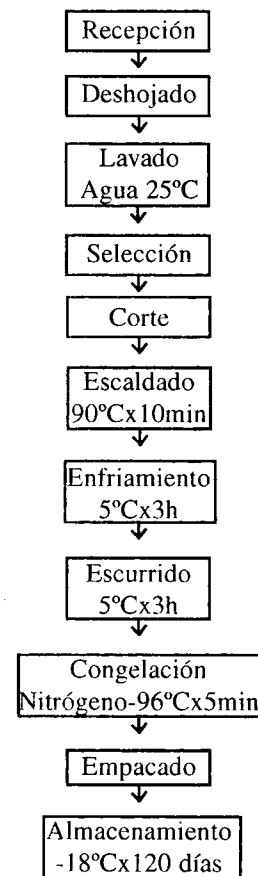
inspeccionadas para verificar la ausencia de daños como quemaduras o deshidratación

Congelación: Se colocaron las mazorcas en la banda o malla de acero inoxidable del túnel de congelación, formando filas de un máximo de 7 mazorcas con una separación de 1cm entre ellas. La congelación se efectuó por convección forzada de nitrógeno líquido en contracorriente en un Aga freeze spleet, a una temperatura de congelación de -96°C y un tiempo de retención de 5 minutos hasta alcanzar una temperatura máxima de -20°C en el centro térmico de las mazorcas.

Empacado: Las mazorcas fueron empacadas manualmente a granel en bolsas de polietileno transparente de 100 micras de espesor, colocándose 36 mazorcas por bolsa, luego se embalaron a razón de 2 bolsas por contenedor.

Almacenamiento: Los contenedores fueron almacenados a una temperatura máxima de -18°C por 120 días.

FIGURA 1
Esquema tecnológico del maíz en mazorca congelada



Análisis físicos

A 70 mazorcas se les hicieron las siguientes mediciones: Longitud en cm desde la base hasta la punta, número de hileras y peso de las mazorcas. Además, fue calculado el rendimiento en el proceso de congelación sobre la base de la relación de los pesos de 100 mazorcas antes y después de procesadas.

Análisis químicos

Los análisis químicos efectuados según la AOAC (9) fueron: Humedad: método N° 925.10. Azúcares reductores y totales: método N°923.09. pH: método N° 981.12. Acidez titulable: método N° 942.15. Actividad de peroxidasa: método N° 96327. Por su parte, los sólidos solubles fueron determinados siguiendo la norma COVENIN N° 924 (9).

Análisis microbiológicos

En los análisis microbiológicos fueron usadas las siguientes Normas COVENIN: Hongos y levaduras: Norma N°1337 (11). Mesófilos y psicrófilos aerobios: Norma N°902 (12). Coliformes: Norma N°1104 (13).

Los análisis químicos y microbiológicos fueron realizados por triplicado en los granos molidos de 4 mazorcas de maíz a los 0 y 120 días de almacenamiento congelado.

Evaluación sensorial

Las mazorcas congeladas por 120 días fueron cortadas en dos trozos y cocinadas en agua hirviendo por 10 minutos para las evaluaciones subjetivas de la apariencia, color, olor, sabor, textura y dulzor por un panel abierto conformado por 10 panelistas entrenados, quienes utilizaron una escala del 1 al 5, en la cual el 3 fue el mejor valor. Además, las muestras fueron clasificadas del 1 al 4 según el grado de preferencia, correspondiendo el 1 a la preferida en mayor grado.

Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, comparando los resultados de los tres híbridos de maíz super dulce con los del maíz dulce Bonanza usado como testigo. A las variables físicas y químicas se les aplicó un análisis de varianza. Donde hubo diferencias significativas se usó la prueba de Dunnett. Aquellas variables físicas y químicas que no cumplieron con los supuestos básicos estadísticos, se analizaron por vía no paramétrica (Kruskal-Wallis). Los resultados de los análisis microbiológicos fueron evaluados de manera descriptiva. En la evaluación sensorial fue aplicado un análisis de varianza vía no paramétrica, complementado con la prueba de Friedman (14).

RESULTADOS Y DISCUSION

Características físicas de las mazorcas de maíz super dulce y rendimiento en mazorcas congeladas

En cuanto a las características físicas, en la Tabla 1 se puede observar que las mazorcas de menor longitud (16,39cm) y con mayor número de hileras (16,18 hil.) correspondieron al híbrido 324. En cambio las mazorcas más largas (18,37cm) fueron las del híbrido Víctor y el número más bajo de hileras (14,67 hil.) el del Krispy king. El largo de las mazorcas de estos dos híbridos coincidió con los valores señalados en la literatura, según la cual, la longitud de las mazorcas de los híbridos de maíz super dulce está entre 17,3 y 21cm y el número de hileras entre 14-20, dependiendo del híbrido (6,7). En este aspecto es importante considerar que sobre estas dos variables influyen varios factores, entre ellos la densidad de siembra, la cual si es muy alta causa la producción de mazorcas más pequeñas y menor número de hileras. Otros factores importantes son las condiciones edafoclimáticas de cada zona en particular, así como las enfermedades y plagas que puedan estar presentes en la misma, afectando el desarrollo normal del cultivo (7,15). De igual manera se debe considerar que el maíz super dulce se caracteriza por tener dos mazorcas una principal y otra secundaria, esta última por su pequeño tamaño y número de hileras no es recomendable que sea cosechada ya que originaría bajos rendimientos.

TABLA I

Longitud, número de hileras de mazorcas de maíces super dulce y rendimiento en mazorcas congeladas

Híbridos	Longitud cm	Hileras N°	Rendimiento %
Krispy King	17,83 ± 1,29	14,67 ± 1,67	64,52
Víctor	18,37 ± 1,50	15,45 ± 1,80	67,37
324	16,39 ± 1,74	16,18 ± 1,84	62,72

El rendimiento de las mazorcas congeladas de los maíces super dulces fue entre 62,72-67,37% (Tabla 1), presentando el menor rendimiento el híbrido 324 y el mayor el híbrido Víctor. El rendimiento del maíz dulce en mazorcas congeladas obtenido en la industria oscila entre 48-54% (15), por lo tanto los resultados de este estudio fueron superiores a los de la planta procesadora, revelando un alto rendimiento en planta de los maíces analizados.

Características químicas, microbiológicas y sensoriales del maíz super dulce congelado

Los resultados de la composición química de los granos de maíz congelado (Tabla 2) revelaron que el contenido de humedad osciló entre 74,04% (324) y 75,66% (Víctor), difiriendo ($P < 5\%$) este último del maíz dulce (su) XZ usado como testigo (67,28%). En el híbrido Víctor, la humedad disminuyó durante el almacenamiento, en cambio en el 324

y en el Krispy king se observó muy poca variación. Es de hacer notar que el almacenaje de vegetales congelados puede provocar pérdidas de humedad asociadas con las propiedades del material de empaque, encontrándose reducciones de 4,5% en el peso del producto almacenado (16). Estos maíces, considerados como hortalizas por su elevado contenido de humedad al momento de la cosecha, presentaron una humedad óptima para el consumo, la cual ha sido establecida en un rango de 70%-75% (1). Los sólidos solubles del grano variaron entre 14,13°Brix (Víctor) y 16,32°Brix (Krispy king), disminuyendo el contenido de todos los maíces en el almacenamiento en congelación. Esta reducción fue mayor en el híbrido Víctor, el cual fue el único en alcanzar diferencias significativas al 5% respecto al patrón (25,16°Brix). Los maíces super dulces presentaron menor cantidad de sólidos solubles que el maíz su, lo cual es atribuido a su escaso contenido de polisacáridos solubles en agua, tales como el fitoglicógeno, que aumentan los °Brix en los granos del maíz dulce (5,17). El contenido inicial de azúcares totales fue alto en los tres híbridos de maíz super dulce (39,42%-44,06%). Varios investigadores (2,3,7,17,18) han señalado que una característica de estos maíces es el alto contenido de azúcares totales, lo cual ha sido atribuido a la ausencia de la enzima ADP glucosa fosforilasa que ocasiona la síntesis del almidón (3,4). Esta alta concentración de azúcares totales permite agrupar a estos maíces como super dulces y tiene gran importancia a nivel industrial y de consumidor (5). En los maíces super dulces congelados se observó una reducción de los niveles iniciales de estos compuestos a cantidades

inferiores al 34%, con valores entre 30,83-33,48%, próximos entre sí y que casi duplicaron el contenido del maíz dulce XZ (16,17%), observándose diferencias a un nivel de significación del 5%, solamente entre el testigo y el híbrido 324. Los azúcares reductores también disminuyeron durante el almacenamiento y los valores, que oscilaron entre 2,41 y 2,61%, no variaron significativamente entre los grupos super dulces y dulce. Garwood et al. (5) no observaron diferencias en el contenido de azúcares reductores en mazorcas frescas de los grupos su y sh2. En tanto que Olsen et al. (18) encontraron altos contenidos de fructosa y glucosa en híbridos super dulces. La reducción de los azúcares en los maíces congelados, evidencian pérdidas de estos compuestos, posiblemente en el proceso de escaldado y durante el almacenamiento, al reaccionar con aminos, aminoácidos y proteínas produciendo acetyl-carbonyl-amina (19). Los niveles iniciales de pH de los maíces super dulces estuvieron en un rango aceptable, entre 6,42 y 6,59 que coincidió con los valores 6,1-6,8 señalados por el US Department of Health, Education and Welfare (20) para el maíz en mazorca. Durante el almacenamiento congelado, estos valores aumentaron, presentando los maíces super dulces un rango de pH entre 7,02 y 7,18, los cuales difirieron a un nivel de probabilidad del 5%, del patrón, cuyo pH fue 6,63. Mientras que la acidez disminuyó y los valores, ubicados entre 0,14% y 0,21%, fueron similares al del maíz XZ (0,21%). En el proceso de congelación a -10°C, el crecimiento microbiano es inhibido, así como las reacciones químicas deteriorativas.

TABLA 2
Características químicas de maíces super dulces en el almacenamiento congelado

Características químicas	Krispy King		Víctor		324		XZ
	0 día	120 días	0 día	120 días	0 día	120 días	120 días
Humedad (%)	75,64	75,31 ns	77,05	75,66*	74,94	74,04 ns	67,28
S. Solubles (°Brix)	18,63	16,32 ns	18,40	14,13*	18,57	15,46 ns	25,16
Azúcares Tot. (%)	44,06	30,83 ns	39,42	31,69 ns	40,35	33,48 *	16,17
Azúcares Red. (%)	13,00	2,54 ns	10,26	2,61 ns	9,76	2,41 ns	2,61
pH	6,42	7,02*	6,56	7,12*	6,59	7,18*	6,63
Acidez (%)	0,36	0,21 ns	0,23	0,14 ns	0,27	0,15 ns	0,21

* = indica efectos significativos (P<5%) respecto al testigo XZ (su).

ns = indica diferencia no significativa respecto al testigo XZ (su).

En relación con la calidad microbiológica, los resultados de la Tabla 3 indicaron que el híbrido 324 presentó, inicialmente, mayor contenido de aerobios mesófilos ($5,5 \times 10^5$ ufc/g) y psicrófilos ($3,5 \times 10^5$ ufc/g) que los híbridos Krispy king y Víctor, siendo estos valores relativamente bajos. Igualmente, los tres maíces super dulces presentaron un escaso contenido de mohos (5×10^1 - $1,5 \times 10^3$ propágulos/g) y levaduras ($8,1 \times 10^2$ - $2,1 \times 10^4$ propágulos/g), lo cual conjuntamente con la ausencia

de coliformes fecales reveló la buena calidad microbiológica de esta materia prima para su procesamiento. Por otra parte, en los maíces congelados la carga inicial se redujo, de forma que no mostraron actividad de psicrófilos y coliformes fecales y la de los mesófilos y coliformes totales fue baja, debido a que durante el almacenamiento a -18°C se inhibe la actividad microbiana (21). No obstante, el contenido inicial de mohos se incrementó durante el almacenamiento en congelación,

alcanzando valores superiores a 1×10^5 propágulos/g en los híbridos Krispy king y Víctor. La presencia de hongos reveló la existencia de esporas antes del procesamiento, las cuales pueden desarrollarse en un amplio intervalo de pH y temperatura (22). En cuanto a las levaduras, el híbrido 324 presentó el mayor conteo ($2,2 \times 10^5$) a los 120 días de su congelación. Algunos autores afirman que en productos congelados los microorganismos indicadores y patógenicos pueden sobrevivir en cantidades variables por extensos períodos de tiempo (23). Las bacterias se encontraron por debajo del estándar establecido por Del Monte Andina (15),

el cual fija un valor $< 1 \times 10^5$ /g en carga microbiana de bacterias o conteo total en placa, presentando los híbridos estudiados entre $2,5 \times 10^3$ (324) y $3,0 \times 10^4$ ufc/g (Krispy king). Además, los estándares establecidos para E. Coli se ubican en valores menores de 10/g y los de este estudio estuvieron por debajo de 3/g. La literatura recomienda para hortalizas congeladas que la carga microbiana en el maíz dulce no exceda de $6,0 \times 10^4$ bacterias/g antes de entrar a los congeladores (24). Finalmente se puede decir que las mazorcas se encontraban dentro de un rango microbiológico aceptable, siendo este un indicador de la calidad de los maíces congelados.

TABLA 3
Calidad microbiológica de maíces super dulces y dulce en el almacenamiento congelado

	Krispy King		Víctor		324		XZ
	0 día	120 días	0 día	120 días	0 día	120 días	120 días
Hongos ¹	$1,5 \times 10^3$	$> 1 \times 10^5$	5×10^1	$> 1 \times 10^5$	6×10^2	6×10^3	$1,1 \times 10^4$
Levaduras ²	$8,1 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$2,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$
Mesófilos ²	$1,6 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^3$	$5,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$	$6,6 \times 10^3$
Psicrófilos ²	$5,3 \times 10^2$	0	$2,5 \times 10^4$	0	$3,5 \times 10^5$	0	0
Coliformes totales ³	93	<3	>2400	4	>2400	<3	75
Coliformes fecales ³	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

1. Propágulos/g 2. Ufc/g 3. NMP/g

Según la evaluación sensorial (Tabla 4), la apariencia de los granos de los maíces sh2 fue catalogada entre 2,8-3,3 (granos uniformes y brillantes), mientras que la del maíz su fue 4,2 (granos poco uniformes y sin brillo), alcanzando solamente el híbrido 324 diferencias significativas al 5% con respecto al testigo. El color de los híbridos Víctor y Krispy king fue evaluado con una puntuación de 3,0 (amarillo) que no difirió del 2,9 del maíz dulce, mientras que el híbrido 324, cuya puntuación fue de 4,2, mostró un color amarillo intenso distinto al del patrón su. El color es una característica intrínseca de cada híbrido y no está afectada por el tipo (su y sh2), de allí las variaciones en la coloración de los maíces analizados. El olor de los maíces super dulces, no difirió del testigo y fue evaluado con valores cercanos a 2, que según la escala utilizada equivale a un leve olor a maíz. Al sabor del híbrido Víctor le fue asignado un 3, que correspondió a un buen equilibrio de sabor, diferente al del patrón, cuyo sabor leve a maíz fue evaluado con 1,8. En cambio, el sabor de los híbridos Krispy king y 324, con puntuaciones de 2,4 y 2,6 respectivamente, fue estadísticamente igual al del maíz dulce. Los maíces super dulces presentaron valores para la textura entre 3,5 y 3,0 equivalentes a una textura firme, crujiente y poco fibrosa, distinta a la del testigo, cuya textura, evaluada con 1,1 fue pegajosa. Estos resultados coinciden con los de Wann et al. (1), quienes señalan que el alto nivel de polisacáridos solubles en agua le brindan una textura cremosa

y consistencia pegajosa a los granos del maíz dulce, mientras que la dureza del pericarpio en los maíces sh2 le proporciona una textura crujiente. El dulzor de los híbridos Víctor y Krispy king fue catalogado como dulce, con valores de 3,0 y 3,1 respectivamente, los cuales difirieron ($P < 5\%$) del patrón, cuyo valor 1,3 correspondió a nada dulce, en cambio el híbrido 324 no se distinguió del maíz XZ, a pesar de que su puntuación 2,6 se aproxima a la de los otros dos híbridos sh2 analizados. La evaluación del dulzor demostró la permanencia del alto contenido de azúcar en los maíces super dulces, aún después de 120 días de congelación. El almacenamiento de los maíces super dulces causa pérdidas de los azúcares totales, pero la concentración inicial de estos compuestos es tan alta que el nivel se mantiene por encima del maíz su (5). En la calificación final no se detectaron diferencias entre los tres híbridos de maíz super dulce y el testigo, sin embargo la puntuación en los híbridos 324, Víctor y Krispy king varió entre 6,0 y 6,3 equivalente a "me gusta muy poco", y en el XZ la puntuación fue de 5,5 ubicándose entre "me es indiferente" y "me gusta muy poco". El panel evaluador prefirió la muestra del maíz Víctor, la cual fue evaluada con un 2, en tanto que al resto de las muestras de maíz sh2 le fueron asignadas puntuaciones de 2,5 (324) y 2,8 (Krispy king) y al maíz dulce 2,7. Esto confirma las mejores características sensoriales en textura, sabor y dulzor de las mazorcas congeladas del híbrido Víctor, aunque sus

diferencias respecto a los otros híbridos super dulces no fueron tan notorias.

TABLA 4
Evaluación sensorial de mazorcas congeladas de maíces super dulces y dulce

Variable	XZ	Krispy king	Víctor	324
Apariencia	4,2	3,1 ns	3,3 ns	2,8*
Color	2,9	3,0 ns	3,0 ns	4,2*
Olor	1,8	2,1 ns	2,3 ns	1,6 ns
Sabor	1,8	2,4 ns	3,0*	2,6 ns
Textura	1,1	3,5*	3,0*	3,2*
Dulzor	1,3	3,1 *	3,0*	2,6 ns
Calificac. final	5,5	6,0 ns	6,3 ns	6,3 ns
Preferencia	2,7	2,8	2,0	2,5

* = indica efectos significativos ($P < 5\%$) respecto al testigo XZ (su).
ns = indica diferencia no significativa respecto al testigo XZ (su).

Actividad residual de la peroxidasa

Los resultados obtenidos (Tabla 5) demostraron que al agregar el peróxido de hidrógeno y guayacol a granos de mazorcas almacenadas por 120 días no hubo cambio de color, sin embargo a partir de los 5 minutos se fueron desarrollando distintas coloraciones hasta llegar a un rojo intenso entre los 20 y 30 minutos de haber comenzado la prueba, lo cual reveló una cierta actividad residual de la enzima. Garrote et al. (25) señalan que en las mazorcas de maíz dulce, tratadas térmicamente a 100°C por 20 minutos, queda una actividad residual del 10%. La distribución de la enzima y su resistencia al calor no es igual en toda la mazorca de maíz dulce, teniendo una gran resistencia en la tusa (25), por otro lado se ha reportado la migración de la enzima desde la tusa a los granos durante el tiempo de almacenamiento (26). Es recomendable aplicar un tratamiento térmico menos intenso, aceptando un remanente de actividad de peroxidasa de 5%-10%, para evitar pérdidas de nutrientes, color y vitaminas por una aplicación excesiva de calor al intentar destruir totalmente esta enzima, así como para ahorrar energía en el proceso de escaldado.

TABLA 5
Actividad de peroxidasa en las mazorcas congeladas de maíces super dulces y dulce

Híbrido	Tiempo de cambio de coloración en minutos			
	No hay coloración	Débilmente rojo	Rojo pálido	Rojo intenso
XZ (su)	0	5	7	20
Krispy king	0	6	13	25
Víctor	0	10	16	30
324	0	6	16	30

En conclusión, los híbridos de maíz super dulces cultivados en Venezuela se adaptaron satisfactoriamente al procesamiento de mazorcas congeladas, resaltando su alto contenido de azúcares y su baja cantidad de sólidos solubles en comparación con el maíz dulce XZ usado como patrón. Además, el sabor, la textura, el dulzor y la apariencia de los granos de los maíces super dulces fueron mejores que los del maíz dulce, destacándose el híbrido Víctor por su mayor rendimiento, así como por sus características sensoriales, por lo cual fue preferido por el panel evaluador.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la empresa Del Monte Andina el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

- Wann EV, Brown GB y Hills WA. Genetic modifications of sweet corn quality. *J Amer Soc Hort Sci.* 1971;96:441-444.
- Carey E, Dickinson D y Rodhes A. Sugar characteristics of sweet corn population from a sugary enhancer breeding program. *Euphytica* 1984;33:609-622.
- Rodhes D. "Citing the sites"(en línea): Sweet corn genetics: Documenting electronic. Sources on the Internet. 20 de agosto de 1997 <<http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort410/sweetc/sw000009.htm>> (Consulta: 4 de agosto de 1998). 1997.
- Creech RG. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics* 1965;52:1175-1186.
- Garwood DL, Mc Ardle FJ, Vanderslice SF y Shannon JC. Postharvest carbohydrate transformations and processed quality of high sugar maize genotypes. *J Amer Soc Hort Sci.* 1976;101(4):400-404.
- Rogers NK. Seed Co. Catálogo de semillas y hortalizas. Boise, Idaho 83711. E.U.A. 1976. 80p.
- Wong AD, Juvik JA, Breeden DC y Swiader JM. Shrunken 2 sweet corn yield and the chemical components of quality. *J Amer Soc Hort Sci.* 1994;119(4):747-755.
- Evensen KB y Boyer CD. Carbohydrate composition of sensory quality of fresh and stored sweet corn. *J Amer Soc Hort Sci.* 1986;111(5):734-738.
- Association of Official Agricultural Chemists. AOAC. Official Methods of Analysis. 15ªed. Arlington Virginia. The Association. 1990. 1298p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. Norma venezolana N°924-88. Determinación de sólidos solubles en frutas y productos derivados. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 1988. 21p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. Norma venezolana N°1337-78. Determinación de hongos y levaduras. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 1978. 6p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN.

- Norma venezolana N°902-78. Determinación de bacterias aeróbicas mesófilas. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 1978. 3p.
13. Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN. Norma venezolana N°1104-84. Determinación del número más probable de coliformes fecales y *E coli*. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 1984. 12p.
 14. Steel R y Torrie J. 1985. Bioestadística. Principios y procedimientos. 2ª ed. Editorial Mc Graw Hill Latinoamericana S.A. México. 622p.
 15. Del Monte Andina CA. Manual de procesos. 1998. 49p.
 16. AGA Venezolana CA. Especificaciones técnicas en procesos. Departamento de Alimentos. Caracas. 1995. 10p.
 17. Zhu S, Mount JR y Collins JL. Sugar and soluble solids changes in refrigerated sweet corn (*Zea mays* L.). *J Food Sci*. 1992;57(2):454-457.
 18. Olsen JK, Giles JE y Jordan RA. Postharvest carbohydrate changes and sensory quality of three sweet corn cultivars. *Scientia Hort*. 1990;44:179-189.
 19. Salunkhe DK. Storage, processing and nutritional quality of fruits and vegetables. Cleveland, Ohio, Ed. CRC Inc. 1974.166p.
 20. US Department of Health, Education and Welfare. pH range. Food Drug Adm, Washington, DC, *Bacteriological Analytical Manual* 2ª ed. 1969.
 21. Cheftel JC y Cheftel, H. Introducción a la Ciencia y Tecnología de Alimentos. Volumen I. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 1976. 497p.
 22. Jarvis B. Rapids methods in food microbiology: A practical approach. *Food Tech*. August 34/11. 1982. p518.
 23. Speeck. ML y Ray B. Effects of freezing and storage an microorganism in frozen foods. A review. *J Food Prot*. 40(5):330-336.
 24. Frazier WC y Westthof DC. Microbiología Básica de los Alimentos. 4ª ed. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 1993. 681p.
 25. Garrote RL, Luna JA, Silva ER y Bertone RA. Prediction of residual peroxidase activity in the blanching-cooling of corn on the cob and its relation to off-flavor development in frozen storage. *J Food Sci*. 1987;52:187-233.
 26. Luh BS y Woodroof JG. Commercial vegetable processing. 2ª ed., Westport, Conn. The Avi Publishing Co. 1988. 784p.

Recibido: 22-02-2001

Aceptado: 02-11-2001

FUNDACION BENGOA
para la Alimentación y Nutrición
CENTRO DE DOCUMENTACION

Efecto de la alta presión hidrostática (APH) en la imbibición de agua, tiempos de cocción y microestructura del *Phaseolus vulgaris*

Elba Sangronis, Albert Ibarz, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Barry G. Swanson

Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela - Universitat de Lleida. Spain - Washington State University. USA

RESUMEN. En este estudio se evaluó el efecto de la alta presión hidrostática (APH) en la imbibición de agua, tiempos de cocción y la microestructura de los cotiledones y la cubierta de granos de *Phaseolus vulgaris*. Los tratamientos a 275, 410, 550 ó 690 MPa a 25°C por 5 min incrementaron la velocidad de imbibición de agua alcanzando la saturación en la mitad del tiempo. La APH redujo los tiempos de cocción (TC) de los granos sin remojar en un 25% a 39% comparable al de los granos remojados en agua por 3 h. Las fotografías con microscopía de barrido (MEB) demostraron una agregación de la matriz proteica, hinchamiento de las paredes celulares y de los gránulos de almidón en las células de los cotiledones de los granos de *Phaseolus vulgaris* tratados con APH. La cubierta externa perdió su suavidad y las capas celulares se hincharon, comportamiento similar al observado cuando los granos se remojan. La APH parece ser una alternativa para reducir los largos tiempos de preparación del *Phaseolus vulgaris*.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, Alta presión hidrostática, agua imbibida, frijoles, tiempo de cocción, microestructura, leguminosas.

SUMMARY. Effect of high hydrostatic pressure on water imbibition, cooking times and microstructure of *Phaseolus vulgaris*. The effect of high hydrostatic pressure (HHP) on water imbibition, cooking times, and microstructure of cotyledons and seed coats of black beans was evaluated. High pressure treatments at 275, 410, 550 or 690 MPa and 25°C for 5 min increased the rate of water imbibition of black beans. The saturation degree of HHP treated black beans was reached 50% faster than the saturation degree of untreated black beans. High hydrostatic pressure treatments reduced the cooking times (CT) of unsoaked black beans by 25% to 39%, similar to black beans soaked for 3 h. The microstructure of HHP treated beans exhibited protein aggregation in cell protoplasm and swelling of cell walls and starch granules. Seed coats of HHP treated black beans were less smooth than seed coats of untreated black beans. The swelling of palisade, hourglass, and parenchyma cells was also observed in HHP treated black beans such as soaked beans. High hydrostatic treatment is an alternative for reducing the preparation long times of *Phaseolus vulgaris*.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, black beans, high hydrostatic pressure, water imbibition, cooking times, legumes, microstructure.

INTRODUCCION

En los países en vías de desarrollo, las leguminosas, en especial las del género *Phaseolus* representan la principal fuente de proteínas para un gran sector de la población (1). En Venezuela, la leguminosa más consumida es el *Phaseolus vulgaris* conocida como caraotas blancas, negras o rojas dependiendo el color de su cubierta externa. La preparación de *Phaseolus vulgaris* incluye el remojo en agua por 8 a 16 horas y cocción por varias horas. La razón del remojo es permitir que el agua penetre las capas externas del grano lo cual aseguraría el ablandamiento más rápido mediante la cocción (2). Pero a veces, ni siquiera el remojo, ni la cocción por varias horas son suficientes para alcanzar el ablandamiento deseado del grano, ello es básicamente debido a la presencia de defectos en la textura en el *Phaseolus*, los cuales se desarrollan durante el almacenamiento del grano a

altas temperaturas y altas humedades, típicas de las zonas tropicales y subtropicales (3). Los defectos de textura de los granos están asociados a cambios químicos y estructurales. El llamado defecto "hard to cook" ocasiona que las caraotas a pesar de que absorben suficiente agua durante el remojo, no se suavizan durante un período de tiempo razonable de cocción (3,4). La adhesión entre las células y la formación de pectatos son algunas de las causas asociadas a granos duros aún después de la cocción (5). En contraste en los granos ablandados por cocción se observa gelatinización del almidón, desnaturalización de proteínas, ruptura de la lamela media y separación entre células del cotiledón (5,6). Dichos efectos son determinantes en la textura del grano después de la cocción y son dependientes de la cantidad de agua imbibida durante los períodos de remojo (5-7).

Adicional a los métodos de preservación tradicionales donde se utiliza calor, en las últimas décadas se está

investigando la aplicación de la alta presión hidrostática y su efecto en las propiedades de los alimentos. En dicha tecnología se aplican presiones del orden de 405 a 910 MPa con la finalidad de procesar el alimento sin necesidad de utilizar calor. A diferencia del procesamiento térmico no hay fase de calentamiento y de enfriamiento, lo que hace que los tiempos de procesamiento sean más cortos, con la ventaja adicional de obtener productos en los cuales se conservan casi intactas las vitaminas y las propiedades sensoriales (8).

Se han estudiado otras metodologías para incrementar la imbibición de agua y acortar así el tiempo de remojo, entre estas se encuentran: aumentar la temperatura de remojo a 30°C (9), añadir NaCl u otras sales o agentes quelantes al agua de remojo (10,11), acondicionamiento de los granos antes del remojo con irradiación gamma (12), microondas (13), vacío (14) o ultrasonido (15). Por esta razón, en esta investigación se evaluó el tratamiento de la APH como un proceso alternativo para modificar la imbibición de agua, los tiempos de cocción y su relación con los cambios observados en la microestructura de los granos del *Phaseolus vulgaris*

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron granos del *Phaseolus vulgaris* L. cv. Black Turtle Soup, adquiridos en un proveedor de Homedale, ID (USA).

Tratamiento: Veinte gramos de granos de *Phaseolus vulgaris* no remojados fueron colocados en bolsas de polietileno (7 cm x 5 cm) y se les añadió agua desionizada (1:3 p/p). Las bolsas fueron cerradas en caliente, y a su vez, dos de ellas fueron colocadas en una bolsa más grande (23 cm x 25 cm) con agua corriente, selladas en caliente y sometidas al tratamiento con alta presión hidrostática (APH) dentro de un equipo (Engineering Pressure Systems, Inc., Andover, MA). El medio presurizante fue una solución acuosa al 5% (v/v) del líquido denominado Mobil Hydrasol 78. Las presiones ensayadas fueron 275, 410, 550 ó 690 MPa a 25°C por 5 min. El tiempo requerido para alcanzar las presiones de ensayos fueron 2,7; 3,3; 4,5 y 5,5 min, respectivamente. Cada tratamiento con APH fue replicado y los análisis fueron realizados por triplicado.

Agua imbibida: Para calcular la imbibición de agua de los granos secos y crudos se les añadió agua desionizada a 25°C (1:5 p/p) por 24 h. Después de cada hora, los granos remojados fueron drenados, pesados, y el exceso de agua fue eliminado con papel absorbente. Una vez pesados, los granos fueron devueltos al recipiente con el agua de remojo. La cantidad de agua imbibida fue expresada en base seca. Para calcular la cantidad de agua imbibida durante el tratamiento

de APH y conocer como el tratamiento afectó la habilidad de los granos de imbibir agua a continuación del tratamiento, los granos fueron drenados, pesados y remojados en agua desionizada a 25°C (1:5 p/p) por 24 horas. La habilidad de imbibir agua como una consecuencia del tratamiento con APH fue determinada después de 3, 6, 9 y 12 h de remojo (5,7,16). La corrección de sólidos perdidos durante el tratamiento de APH ó el remojo no fue considerada.

Tiempos de cocción: Los tiempos de cocción (TC) fueron determinados usando la versión modificada de la olla de Matson (17-19). El TC de los granos de caraotas se define como el tiempo en minutos requerido para penetrar el 50% del grano (17). El TC de las caraotas negras tratadas con APH se determinó después del tratamiento, mientras que el TC de las no tratadas con APH fue determinado en los granos sin remojar y los granos después del remojo por 3, 6, 9 ó 12 h.

Microscopia de barrido: Los granos crudos, remojados por 16 horas, remojados y cocidos y tratadas con APH, fueron fracturados transversalmente con una hojilla, las secciones fueron fijadas con glutaraldehído/formaldehído (2% / 2%) en buffer fosfato pH 7,2 (0,5 M) durante 2 h a 4°C. Las secciones fijadas fueron enjuagadas con el mismo buffer y deshidratadas con una serie de soluciones de etanol (30, 40, 60, 75, 90, y 100%), durante 10 min. en cada (7,18). Las secciones deshidratadas, se colocaron en un secador por punto crítico (Samdri-PVT-3B, Rockville, MD) se cubrieron con oro (300 µm) en un recubridor (Technics, San José, CA), y se examinaron con un microscopio de barrido (S-570) Hitachi, Corp, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 20 kV (20).

Análisis estadístico: Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Minitab®, versión Release 12 (Minitab Inc, 1997). La media de la imbibición de agua y el TC fueron calculados. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó siguiendo el procedimiento del modelo lineal. La comparación entre los granos crudos, remojados y tratados con APH se hizo con la prueba pareada t (21). El nivel de significancia fue definido a $p < 0,05$.

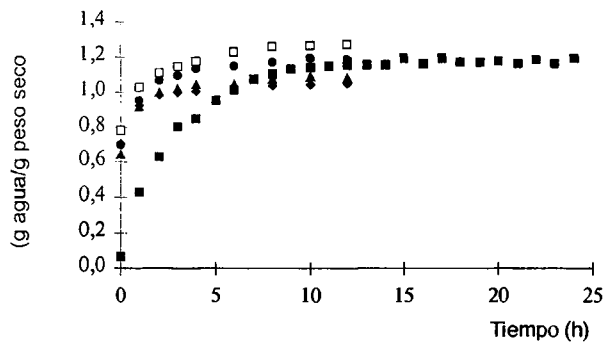
RESULTADOS Y DISCUSION

Imbibición: La curva de imbibición de agua de los granos de *Phaseolus vulgaris* remojados en agua, normalmente exhibe una forma característica, la cual se pudo validar en este estudio (Figura 1), en dicha figura se distinguen dos fases: una primera fase donde los granos imbiben agua rápidamente del medio de remojo, seguida de una fase donde los granos se saturan con el agua y alcanzan un equilibrio, el

cual generalmente ocurre después de 10 a 16 h de remojo (5,7,16). Se observó que los granos de *Phaseolus vulgaris* no tratadas alcanzaron la saturación a las 10-12h de remojo, tiempo comparable con estudios previos (7), mientras que en aquellos granos tratados con APH, la saturación fue alcanzada en un rango de 5 a 6 horas de remojo, lo que representa un 50% de reducción de tiempo de remojo. Con respecto a la cantidad de agua imbibida, esta se incrementó en aproximadamente 10-12 veces dependiendo de la presión utilizada. Los granos tratados a 550MPa presentaron un contenido de humedad significativamente mayor que los granos tratados a 275, 410 ó 690MPa. Las diferencias de agua imbibida por la aplicación de 275, 410 ó 690 MPa no fueron significativas entre sí.

FIGURA 1

Imbibición de agua en las carotas negras crudas no tratadas □; tratadas a 275 MPa ●; 410 MPa ▲; 550 MPa ◻ ó 690 MPa ◆, remojadas por 24 horas



Las diferencias en el patrón de imbibición de agua son atribuidas al comportamiento de la cubierta externa de los granos así como también a otras estructuras como el micrópilo y el hilum, los cuales controlan la entrada de agua en las semillas de leguminosas (2,22). El aumento de la velocidad y la cantidad de agua imbibida puede ser consecuencia del efecto físico que la APH pudo ejercer en las estructuras de la parte externa del grano.

Tiempos de cocción: El registro del tiempo al cual cada uno de los granos de *Phaseolus vulgaris* alcanzó la textura que permitió la penetración del penetrómetro se presenta en la Tabla 1. La media de los tiempos de cocción (TC) de los granos no tratados ni remojados fue de 44 min. El remojo redujo el TC entre un 30 a 56 % (Tabla 1) según se incrementó el tiempo de remojo (3-12 h). El TC de los granos tratados a 690 MPa fue 27 min lo que representó un 39% de reducción comparada con los granos de carotas crudas, no tratadas ni remojadas (44 min). El tratamiento a 550 MPa redujo el TC de las carotas negras en un 36%. Tratamientos a 410 ó 275 MPa redujeron el TC en un 30 y 25%, respectivamente. Las

diferencias entre el TC los granos tratados a 275, 410, 550 ó 690 MPa no fueron significativas entre sí, a su vez estos tratamientos por 5 min modificaron el TC de los granos y lo hicieron equivalente al TC de los granos remojados por 3 h.

TABLA 1

Tiempo de cocción (TC) de los granos de *Phaseolus vulgaris* sin remojo, remojados por 3,6,9 ó 12 horas y tratados con APH sin remojo previo

Tratamiento	TC (min)
Sin remojo ¹	44,1 ± 1,2 ^a
Remojadas 3 h ¹	30,9 ± 3,8 ^b
Remojadas 6 h ¹	21,6 ± 1,1 ^c
Remojadas 9 h ¹	21,8 ± 1,1 ^c
Remojadas 12 h ¹	19,6 ± 1,4 ^c
APH a 275 MPa ²	31,9 ± 3,7 ^b
APH a 410 MPa ²	30,8 ± 2,5 ^b
APH a 550 MPa ²	28,3 ± 1,3 ^b
APH a 690 MPa ²	27,2 ± 0,9 ^b

APH= alta presión hidrostática

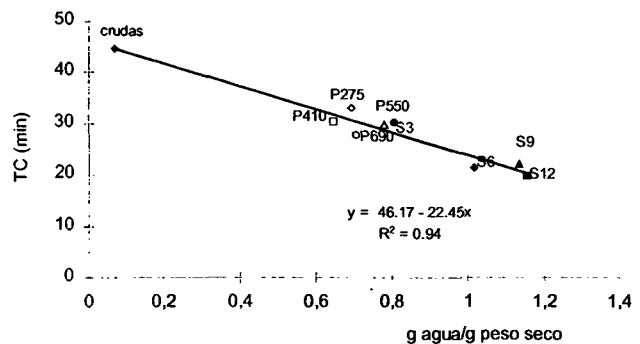
¹Sin tratamiento con APH; ² Sin remojo previo

Medias y desviación estándar de triplicado. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05)

Aquellos granos de *Phaseolus vulgaris* que presentaron el mayor porcentaje de agua imbibida durante el remojo, requirieron menores TC que aquellos que imbibieron menos agua. La regresión lineal entre la humedad inicial y el TC (Figura 2) demostró que conociendo el contenido inicial de las muestras antes de la cocción, puede predecirse con precisión (R²= 0,94) el TC de los granos usando la siguiente ecuación: TC = 46,17-22,45 X (donde X es el contenido de humedad antes de la cocción).

FIGURA 2

Tiempo de cocción (TC) como una función del contenido inicial de humedad de los granos de *Phaseolus vulgaris* remojados (S) por 3, 6, 9 ó 12 h y granos tratados con APH (P) a presiones de 275, 410, 550 ó 690 MPa



Microscopía de barrido: En los granos de *Phaseolus vulgaris* se distinguieron gránulos elipsoidales de almidón inmersos en la matriz proteica la cual está formada por cuerpos proteicos ovals que comprimen dicha matriz (Figura 3). Los cuerpos proteicos y los gránulos de almidón sobresalieron de la matriz proteica cuando los granos fueron remojados por 10 horas (Figura 4), en la microestructura de los cotiledones de los granos cocidos se observó la separación entre las células y remanentes de la lamela media interconectando las células (Figura 5).

FIGURA 3

Microfoto obtenida por barrido (MEB). Gránulos de almidón (S) y cuerpos proteicos (PB) Barra=25µm

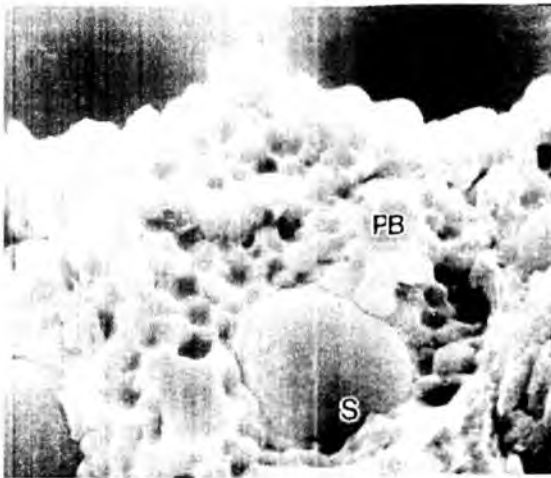


FIGURA 4

Micrografía obtenida por barrido (MEB) de los granos de *Phaseolus vulgaris* remojados por 10 h. Desorganización de la matriz proteica (P), con gránulos de almidón (S). Barra=25µm

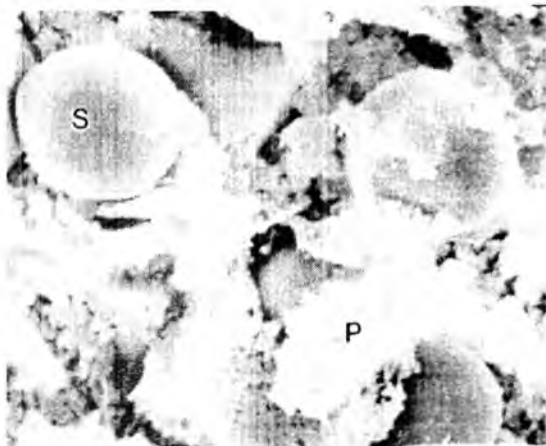
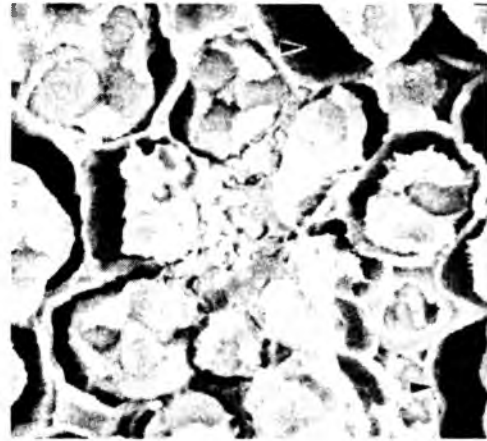


FIGURA 5

Micrografía obtenida por barrido (MEB) de los granos de *Phaseolus vulgaris* remojados y cocidos. La flecha indica la separación entre las células y remanentes de la lamela media (MR) conectando las células. Barra = 25µm



En estudios previos, dichas características han sido relacionadas con el ablandamiento de las caraotas negras suaves por efecto de la cocción (3,4). El tratamiento con APH produjo hinchamiento de las paredes celulares, con algunos gránulos de almidón intactos. Se observó además, una mínima separación entre las células comparadas con las caraotas negras cocidas (Figura 6) y los cuerpos proteicos perdieron su forma definida y redondeada, mientras que la proteína se agregó (Figura 6 y 7). Un incremento de la presión no produjo diferencias entre los efectos observados a nivel celular.

FIGURA 6

Microfotos obtenidas por barrido (MEB) de los granos de *Phaseolus vulgaris* tratados con 275 MPa (A); 410 MPa (B). No separación entre las células, gránulos de almidón intactos, agregación de proteínas y engrosamiento de las paredes celulares. Barra = 50µm

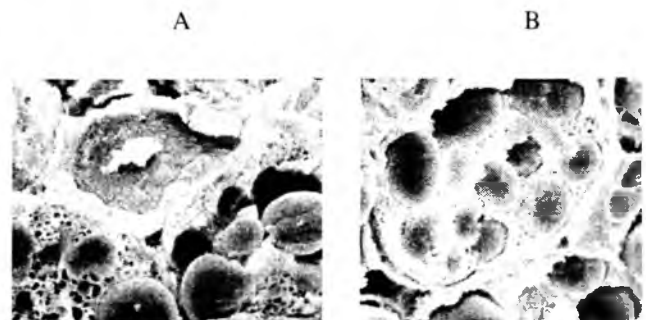


FIGURA 7

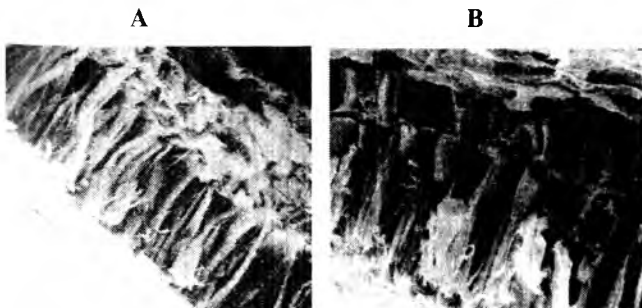
Microfotos obtenidas por barrido (MEB) de los granos de *Phaseolus vulgaris* tratados con 690 MPa. No separación entre las células, agregación de proteínas y engrosamiento de las paredes celulares. Barra = 50µm



La cubierta externa de los granos crudos de *Phaseolus vulgaris*, presentaron la suavidad típica de los granos de leguminosas secos y crudos (Figura 8A). Mientras que la cubierta externa de los granos tratados con APH (Figura 8 B), presentó un hinchamiento o alargamiento de las escléridas también observado cuando los granos se remojan en agua por varias horas. De lo anterior se deriva que el tratamiento con APH parece disminuir la resistencia de la cubierta externa y de las células del parénquima a la entrada de agua, aumentando así la velocidad de imbibición de agua y la cantidad de agua imbibida.

FIGURA 8

Microfotos obtenidas por barrido (MEB) de las capas externas de los granos de *Phaseolus vulgaris* A. Granos crudos exhibiendo superficie suave, células alargadas y células pequeñas. B. Granos tratados a 690 MPa con hinchamiento de las escléridas y del parénquima Barra = 50 µ



En este trabajo se demostró que tratamientos de APH por 5 minutos a temperatura ambiente reducen los prolongados tiempos de preparación los cuales son una limitante del consumo de *Phaseolus vulgaris*. Es importante resaltar que la aplicación de esta nueva tecnología requiere una alta inversión inicial en la adquisición del equipo, pero los costos de procesamiento son mucho menores a la mayoría de los tratamientos térmicos usados para ablandar la textura de los granos de leguminosas. Adicionalmente, los tratamientos con APH no generan efluentes, en contraposición de la gran cantidad generadas por el remojo de los granos del *Phaseolus vulgaris*

REFERENCIAS

1. Bressani R. Antiphysiological factors and apparent protein digestibility of *Phaseolus vulgaris*. Grain Legumes 1994; 7: 21-22.
2. Sefa-Deheh S, Stanley D. Textural implications of the microstructure of legumes. Food Technol 1979; 33:77-83.
3. Stanley D, Aguilera J. Structure and texture in cooked beans. J. Food Biochem. 1985; 9:277-323.
4. García E, Lajolo F, Swanson B. A comparative study of normal and hard-to-cook Brazilian common beans (*Phaseolus vulgaris*): Ultrastructural and histological aspects. Food Structure 1993; 12:47-154.
5. Sefa-Dedeh S, Stanley D, Voisey. Effect of the storage time and conditions on the hard-to-cook defect in cowpea (*Vigna unguiculata*). J Food Sci 1978; 44:790-795.
6. Liu K, Hung Y, Phillips R. Mechanism of hard to cook defect in cowpeas: verification via microstructure examination. Food Structure 1993;12:51-58.
7. Berrios J, Swanson B, Cheong A. Physico-chemical characterization of stored black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Food Resear Inter 1999; 32:669-67
8. Zimmerman F, Berman C. Isostatic pressure equipment for food preservation. Food Technol 1993; 7(6):162-163.
9. Abu-Ghannam N, Mckenna B. Hydration kinetics of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L). J Food Sci 1997; 62:520-523.
10. Del Valle J, Bourne M. Water absorption and swelling in dry bean seeds. J Food Proc Pres 1992;16:75-98.
11. Garcia-Vela L, Del Valle J, Stanley D. Hard-to cook defect in black beans: The effect of soaking in various aqueous salt solutions. Can. Inst. Sci. Technol. J 1991; 24:60-67.
12. Rao V, Vakil U. Effects of gamma-irradiation on flatulence causing oligosaccharides in green gram (*Phaseolus aureus*). J Food Sci 1983; 48: 1791-1793.
13. Abdul-Kadir R, Bargman T, Rupnow J. Effect of infrared heat processing on rehydration rate and cooking of *Phaseolus vulgaris* (Var. Pinto). J Food Sci 1990; 55:1472-1473.
14. astry S, McCafferty F, Murakami E, Kuhn G. Effects of vacuum hydration on the incidence of splits in canned kidney beans. J Food Sci 1985; 50: 1501- 1503.
15. Uebersax M., Ruengsakulrach S, Occena L. Strategies for processing dry beans. Food Technol 1991.45: 104-108, 110-111.

16. Giami S, Okwechime I. Physicochemical properties and cooking quality of four new cultivars of Nigerian cowpea (*Vigna unguiculate L Walp*). *J Sci. Food Agric* 1993; 57:281-286.
17. Jackson G, Varriano-Marston E. Hard-to-cook phenomenon in beans: Effect of accelerated storage on water imbibition and cooking time. *J Food Sci* 1981; 46:799-803.
18. Hsieh H, Pomeranz Y, Swanson B. Composition, cooking time and maturation of azuki (*Vigna angularis*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal Chem* 1992; 69:244-248.
19. Nielsen S, Brandt W, Singh B. Genetic variability for nutritional composition and cooking time of improved cowpea lines. *Crop Sci.* 1993;33:469-472.
20. Kadharmestan C, Baik B, Czuchajowska Z. Whey protein concentrate treated with heat or high hydrostatic pressure in wheat based products. *Cereal Chem* 1998; 75:762-766.
21. Steele R, Torrie J, Dickey D. *Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach*. 3rd edition. Mc Graw-Hill Book Co. NY. 1997. pp.138-177.
22. Swanson B. Traditional and potential products from grain legumes. Invited presentation to symposium *Grain Legumes as alternative Crops*. Center for Alternatives Crops and Products. Minneapolis, MN. 1987. July.

Recibido: 29-10-2001

Aceptado: 04-04-2002

Calidad nutricional y aceptabilidad de un producto formulado con carne de pollo deshuesada mecánicamente, plasma y glóbulos rojos de bovino

Betty Benítez, Anangelina Archile, Lisbeth Rangel, Mariela Bracho, Maigualida Hernández y Enrique Márquez

La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

RESUMEN. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad nutricional y aceptabilidad de un producto cárnico formulado con carne de pollo deshuesada mecánicamente (40%), plasma (40%) y glóbulos rojos de bovino (3%) como principales ingredientes. Al producto se le determinó el contenido de proteínas, grasa, humedad, cenizas (AOAC), hierro, calcio (espectrofotometría de absorción atómica) y aminoácidos esenciales (cromatografía líquida de alta resolución, HPLC). Para la evaluación biológica de las proteínas se realizaron determinaciones de digestibilidad aparente e Índice de Eficiencia Proteica (PER). La aceptabilidad del producto (sabor, color y olor) fue evaluada mediante una encuesta realizada a 277 niños de dos instituciones escolares de la ciudad de Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela. El producto aporta 10,7% de proteínas, 4,4% de grasa, 68,6% de humedad, 2,9% de cenizas, 4,9 mg/100 g de hierro y 46,6 mg/100g de calcio. Los aminoácidos esenciales se encuentran por encima de los requerimientos recomendados por la FAO para una proteína de buena calidad. El producto presenta un 92,40% de digestibilidad aparente y un PER de 2,18. El alimento formulado presentó una alta aceptabilidad por parte de la población escolar con un 91,3% de aceptación para el sabor, 81,2% para el color y 92,4% para el olor. El gran aporte de nutrientes y su elevado porcentaje de aceptabilidad, convierten a este producto en un alimento alternativo de bajo costo, adecuado para su inclusión en programas de intervención nutricional.

Palabras clave: Carne de pollo deshuesada mecánicamente, sangre animal, producto cárnico nutricional, subproductos animales.

SUMMARY. Nutritional quality and acceptability of a product formulated with mechanically deboned poultry meat, plasma and bovine red cell. The purpose of this research was to evaluate the nutritional quality and acceptability of a meat product formulated with mechanically deboned poultry meat (40%), bovine plasma (40%) and bovine red cells (3%) as major ingredients. Proteins, fat, humidity and ash were determined by AOAC procedure, iron and calcium by Atomic Absorption Spectrometry and essential amino acids by HPLC. Biological evaluation was performed using digestibility and PER procedures. To evaluate the acceptability (flavor, color and odor) of the product were used 277 children. Results indicated that 100 g of the formulated meat product contain 10,7 g of proteins, 4,4 g of fat, 68,6 g of humidity, 2,9 g of ash, 4,9 mg of iron, 46,6 mg of calcium. Essential amino acids are above the FAO requirements for a highly nutritional protein digestibility (92.4 %) and PER (2.18). Acceptability was 91.3 % for flavor, 81.2% for color and 92.4% for odor. The high nutritional quality and acceptability along with the low cost make this meat product suitable for government social programs.

Key words: Mechanically deboned poultry meat, animal blood, nutritive meat product, animal subproduct.

INTRODUCCION

Todos los seres vivos, incluyendo el hombre, deben tener una fuente adecuada de proteínas en su alimentación para crecer y conservarse de manera autónoma (1); sin embargo, en muchas partes del mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo, resulta poco accesible las fuentes de proteínas debido a su alto costo, en especial las de origen animal las cuales son consideradas proteínas de buena calidad, por lo que la mayor parte de la población no recibe las raciones necesarias de este nutriente, originando una desnutrición por déficit proteico (1,2).

La necesidad del consumo de proteína animal ha incentivado la búsqueda de fuentes alternas, capaces de ofrecer alimentos altamente proteicos con cualidades organolépticas aceptables, de allí que las investigaciones apunten hacia el desarrollo de nuevos productos no convencionales para ser utilizados en la alimentación humana (3,4).

La carne de pollo deshuesada mecánicamente (CPDM) y la sangre animal, constituyen dos subproductos alimenticios que se caracterizan por presentar un adecuado porcentaje de proteínas de buena calidad. El alto contenido proteico (14,5%) y proporción balanceada de los aminoácidos esenciales que

presenta la CPDM permiten predecir su elevado valor biológico, lo que aunado a su relativo bajo costo en comparación con otras fuentes proteicas, ha incrementado su consumo por parte de la población (5,6).

La sangre animal contiene cerca de 18% de proteínas, por lo que representa una fuente potencial de aminoácidos esenciales; sin embargo, en los mataderos es desechada en su mayor parte, desperdiciándose una importante fuente proteica, a su vez que se convierte en un efluente altamente contaminante (7). La utilización de la sangre en la formulación de alimentos es limitada debido al fuerte olor y sabor que imparte a los mismos (7); por esta razón, la sangre es centrifugada obteniéndose el plasma y paquete globular. El plasma no imparte olor ni sabor a los productos; sin embargo, los glóbulos rojos deben agregarse de manera controlada para evitar serias modificaciones en las características organolépticas de los alimentos. El plasma y los glóbulos poseen propiedades funcionales favorables para su utilización en la industria de los alimentos, tales como solubilidad, gelificación, emulsificación, así como también alta capacidad de retención de agua (7,8). En la formulación de productos cárnicos algunas de estas características son aprovechadas para aumentar el porcentaje de rendimiento y estabilidad del producto final (9-11).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad nutricional y aceptabilidad de un producto cárnico tipo embutido formulado con CPDM, plasma y glóbulos rojos de bovino como principales ingredientes, a fin de ser propuesto como alternativa nutricional para los programas de alimentación escolar.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de la materia prima

La CPDM se obtuvo de una Industria Procesadora de pollo del Estado Zulia. La empresa produce la CPDM a partir de una combinación de subproductos tales como cuellos, espinazos y otras partes del pollo golpeadas o maltratadas, procesadas en una máquina deshuesadora Beehive modelo RSCT-02RA. Posteriormente, la CPDM producida se subdividió en porciones de 1 kg empacadas en bolsas de plástico y colocadas en túneles de congelación, durante 16 h a 24 h. La CPDM fue seleccionada al azar y transportada al laboratorio bajo condiciones de refrigeración para la elaboración del producto cárnico.

La sangre de bovino se obtuvo de un matadero del Estado Zulia, Venezuela, la cual fue recolectada en envases plásticos limpios que contenían 100 mL de una solución de tripolifosfato de sodio al 2% p/v por cada litro de sangre (8). Posteriormente, fue transportada bajo condiciones de refrigeración al laboratorio de investigación (5°C), donde se separó en plasma y paquete globular en una centrífuga marca International modelo K6998M23 a 2500 rpm por 25 min. El

resto de los ingredientes fue obtenido de diferentes expendios de comida de la ciudad de Maracaibo, Estado Zulia.

Elaboración del producto cárnico

Los ingredientes utilizados en la formulación del producto cárnico (Tabla 1) fueron ajustados hasta obtener una emulsión estable con un contenido entre el 10% y 11% de proteínas, basados en experimentos previos realizados por Benítez et al. (12). La CPDM, el plasma y los glóbulos rojos de bovino fueron mezclados con las sales cloruro de sodio y tripolifosfato de sodio en una licuadora industrial marca ELECTROMASTER. Seguidamente, se adicionó el resto de los ingredientes (harina de trigo, especias y azúcar) hasta obtener una consistencia homogénea. Durante este proceso, la temperatura se mantuvo por debajo de 10°C. La mezcla fue embutida en tripas artificiales de 12 cm de diámetro y cocidas a vapor (90°C) hasta alcanzar una temperatura interna de 70°C. Posteriormente, el producto fue rociado con agua a temperatura ambiente por 15 min y refrigerado a 5°C durante 24 h. El rendimiento del producto se calculó por diferencia de peso antes y después del cocimiento.

TABLA 1
Ingredientes utilizados en la formulación
del producto cárnico

Ingredientes	g/100 g
CPDM	40,0
Plasma de bovino	40,0
Glóbulos rojos de bovino	3,0
Harina de trigo	12,0
Cloruro de sodio	2,0
Especias	1,5
Azúcar	1,5
Mezcla Total	100

Análisis químico

En un período de 5 meses se elaboró un total de 50 productos cárnicos de aproximadamente 320 g, cada uno de los cuales se trituró por separado en un procesador de alimentos marca Oster, hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se determinó a cada producto el contenido de proteína, grasa, humedad y cenizas siguiendo la metodología propuesta por la AOAC (13).

Las determinaciones de hierro y calcio se realizaron empleando la técnica instrumental de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama, de acuerdo a la metodología propuesta por Granadillo et al. (14). Previo al análisis espectrofotométrico, las muestras fueron sometidas a un proceso de mineralización, empleando reactores de alta presión PAR, modelo 4782, irradiados en un horno de microondas CEM, modelo MDS 81D. Se colocó una alícuota

de las muestras (40 mg, aproximadamente) y 2,5 mL de ácido nítrico concentrado en una cápsula de teflón, la cual fue cerrada e introducida en una carcasa transparente a la microondas. El sistema se irradió por 70 seg al 100% de potencia (600 MHz). Los recipientes se enfriaron por 3 h y se aforaron a 25 mL. Para el análisis, se dispuso de un espectrofotómetro de absorción atómica de llama marca Perkin-Elmer Modelo 460, con llama de aire/acetileno y fuente de luz proporcionada por una lámpara de cátodo hueco específica para cada metal. Las condiciones instrumentales usadas para la determinación de estos metales fueron: para el hierro 248,3 nm de longitud de onda; 0,2 nm de banda espectral; 1,0 L/min de flujo de aire y 1,0 L/min de flujo de acetileno, y para el calcio: 422,7 nm de longitud de onda; 0,7 nm de banda espectral; 1,0 L/min de flujo de aire y 1,0 L/min de flujo de acetileno.

El contenido de aminoácidos fue determinado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Las muestras fueron sometidas a un proceso de hidrólisis ácida con HCl 6 N en estufa a 120°C por un lapso de 22 h. Posteriormente, se llevó a cabo una derivatización pre-columna con una solución fluorescente de OPA (Orthoptalaldehyde), al momento de la inyección (15). Para el análisis se dispuso de un equipo de HPLC marca SHIMADZU, acoplado a un sistema controlador modelo SCL-6B, dos bombas de alta presión modelo LC-6A con cámara mezcladora de solventes, un inyector automático modelo SIL-6B programado para inyectar 20 µL de muestra, un horno para columna modelo CTO-6A y un detector de fluorescencia FLD-6A a una longitud de onda de 350 nm para la excitación y 450-800 nm para captar la fluorescencia emitida por los aminoácidos. El detector fue acoplado a una computadora marca Epson Action Tower 8000 Con Software Shimadzu Class-VPTM, versión 4,2. La columna cromatográfica empleada fue de C-18 Altex Ultrasphere ODS de 15 cm de longitud y 4,6 nm de diámetro interno y partículas de sílica esférica de 5 µm. Se utilizó como fase móvil un gradiente binario (16).

Valoración biológica

La calidad nutricional de la proteína del alimento se midió en forma de Digestibilidad Aparente e Índice de Eficiencia Proteica (PER) según la metodología propuesta por la AOAC (13). Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 20-23 días de edad, las cuales se alojaron en jaulas individuales (12 horas luz/12 horas oscuridad) a temperatura ambiente. Antes de iniciar la investigación los animales fueron sometidos a un período de aclimatación de tres días bajo las mismas condiciones ambientales de temperatura, aire e iluminación. La dieta y el agua fueron proporcionadas *ad libitum* durante la experimentación, controlando a diario la cantidad de alimento consumido, así como el peso de los animales y la cantidad en gramos de heces excretadas.

Evaluación de la aceptabilidad

Se empleó un panel de degustación no entrenado, constituido por 277 niños de ambos sexos y en edades comprendidas entre 6 años y 12 años, los cuales fueron seleccionados al azar de dos Escuelas de la ciudad de Maracaibo, Estado Zulia. Se evaluó el sabor, color y olor del alimento. El producto fue degustado por los niños a las 10:00 AM (una hora después del receso) a una temperatura de 40°C, en porciones de aproximadamente 4 gramos. Se orientó a cada niño de manera individualizada para que expresara su opinión en relación a los parámetros de interés. Para la recolección de los datos se empleó un instrumento diseñado en forma sencilla y con un vocabulario simple, en el cual, los niños en forma dirigida respondieron con una equis (X) aquella alternativa que reflejó mejor su opinión sobre los parámetros evaluados. Los niños de menor edad que tenían dificultad en la lectura y comprensión del instrumento fueron asistidos al momento de responder el mismo. La escala para la evaluación del producto fue la siguiente: me gusta mucho, me gusta, me es indiferente, me gusta poco y no me gusta.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados usando el Programa SAS PROC GLM (17). Los valores de media y desviación estándar fueron obtenidos utilizando el diagrama de cajas y líneas como técnica exploratoria de análisis de datos.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 2 muestra el rendimiento y la composición química del producto cárnico formulado. El alimento presentó un alto rendimiento (96,0%), lo que puede ser atribuido a la capacidad de las proteínas miofibrilares presentes en la CPDM y de las proteínas sanguíneas de bovino de ligar o atrapar un alto porcentaje de grasa y agua (18).

TABLA 2
Rendimiento y composición química del producto cárnico

Parámetros	Resultados *
Rendimiento	96,0 ± 1,07
Proteína	10,7 ± 0,43
Grasa	4,4 ± 1,20
Humedad	68,6 ± 1,56
Cenizas	2,9 ± 0,57
Hierro**	4,9 ± 0,50
Calcio**	46,6 ± 1,21

n = 50

* Expresados como porcentaje (± SD) del componente en relación al total de muestra húmeda.

** mg/100 g (muestra húmeda).

Las proteínas cumplen funciones diversas, participando en todos los procesos biológicos y constituyendo las estructuras fundamentales en los seres vivos; de este modo, se ha propuesto que las proteínas deben aportar en la dieta entre el 9% y 14% del total de calorías, siendo deseable que un tercio de las mismas sean de origen animal (1). El producto cárnico posee un 10,7% de proteínas, por lo que 100 g del mismo proporcionaría entre el 13,32% y el 21,32% de los requerimientos proteicos diarios para niños entre 7 años y 12 años (2).

Las grasas son fuentes de energía útil para aumentar la densidad calórica de la dieta (1); sin embargo, es importante cuidar el consumo excesivo de las mismas, ya que evidencias epidemiológicas han demostrado que una ingesta de grasa superior al 30% de las calorías totales podría influir en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (19). El producto aporta un bajo porcentaje de este componente (4,4 %).

Los valores de hierro y calcio fueron de 4,9 mg/100g y 46,6 mg/100g, respectivamente. El contenido de hierro obtenido en el producto, proviene principalmente de la hemoglobina de la sangre animal y de la CPDM; ésta última presenta un alto contenido de hierro debido a la presencia en la misma de pigmentos hemo liberados de la médula ósea y otros fluidos óseos como resultado de la presión ejercida por la máquina deshuesadora sobre los huesos durante su obtención (20). De acuerdo a los resultados obtenidos, 100 g del producto aportan entre el 35,28 % y el 61,75 % de los requerimientos diarios de este mineral para escolares entre 7 años y 12 años (2), por lo que puede ser considerado como un excelente vehículo para la prevención de la anemia por deficiencia de hierro. El contenido de calcio del producto cárnico se atribuye principalmente a la CPDM debido a que en su obtención, astillas de hueso penetran a la misma provocando de esta manera el incremento en el contenido de este mineral (20).

La Tabla 3 muestra el perfil de aminoácidos esenciales del producto cárnico. Al comparar los valores obtenidos con los requerimientos diarios de aminoácidos esenciales recomendados por la Food Agriculture Organization/World Health Organization/United Nations University (FAO/WHO/UNU) (21) para niños en edad escolar, se observa que los aminoácidos esenciales estudiados se encuentran por encima de los valores de referencia, a excepción de la metionina; sin embargo, es importante destacar, que aunque se vea reflejado un nivel inferior de este aminoácido al propuesto por la FAO/WHO/UNU (21), la comparación no es válida, puesto que estas instituciones reportan valores obtenidos por la sumatoria de los aminoácidos azufrados (metionina + cisteína). La adecuada proporción de los aminoácidos esenciales en el alimento formulado, puede deberse al efecto de complementariedad existente entre las proteínas utilizadas en su formulación; si bien la metionina y la isoleucina son

aminoácidos limitantes en la proteína sanguínea de bovino (22), al mezclarse con las proteínas de la CPDM se corrige su deficiencia. Archile et al. (6), señalan que las proteínas de la CPDM presentan todos los aminoácidos esenciales en una proporción adecuada para satisfacer los requerimientos nutricionales.

TABLA 3
Perfil de aminoácidos esenciales del producto cárnico

Aminoácidos **	Producto cárnico	FAO/WHO/UNU Niños en edad escolar (6-12 años)
Isoleucina	8,3	2,8
Leucina	7,1	4,4
Lisina	9,7	4,4
Metionina	1,8	2,2***
Fenilalanina + Tirosina	8,2	2,2
Treonina	4,4	2,8
Valina	3,0	2,5
Histidina	7,9	1,9
Triptófano	ND	ND

* FAO/WHO/UNU(21)

** g/100 g de proteína.

*** Sumatoria de metionina más cisteína.

ND: No determinado

La Tabla 4 muestra los valores de digestibilidad aparente y PER del producto estudiado. De acuerdo con los resultados obtenidos, las proteínas del alimento formulado son altamente digeribles con un 92,40 % de digestibilidad. Algunos autores han reportado valores de digestibilidad aparente de 91,2% y 90,8% para la harina de sangre (23), mientras que otros han reportado una digestibilidad in vitro de 92% para las proteínas del plasma dializado y un 83% para el plasma no dializado (24). El PER obtenido revela que los animales ganaron 2,18 g de peso por cada gramo de proteína ingerida, lo que confirma que las proteínas utilizadas en la formulación del producto son capaces de favorecer y sustentar el crecimiento de animales jóvenes. MacNeil et al. (25), evaluaron la calidad nutricional de la CPDM, reportando valores de PER de 2,47 a 2,65; en tanto, que Babji et al. (26) al determinar el PER de las proteínas de la CPDM en ratas jóvenes, obtuvieron un valor de 2,34. Con relación a las proteínas sanguíneas animales, Young y Lyon (27) estudiaron el valor nutricional de la globina y de las proteínas plasmáticas de la sangre de bovino, los reportes indicaron un PER bajo, el cual fue mejorado al suplementar con isoleucina. Cóser et al. (23), a su vez señalan la ganancia de peso en animales alimentados con harina de sangre suplementada con isoleucina, obteniendo un PER de 2,60. En este caso la mezcla de CPDM con plasma y glóbulos rojos, produjo niveles de isoleucina

lo suficientemente altos como para no seguir siendo considerando como aminoácido limitante.

TABLA 4

Valor biológico de la proteína del producto cárnico medido como Digestibilidad Aparente y PER

Digestibilidad Aparente	92,40
PER	2,18

Al analizar los resultados de la prueba de aceptabilidad del producto (Tabla 5) realizada a los 277 niños, se obtuvo un 91,3% de aceptabilidad en cuanto al sabor del producto sumando las categorías me gusta mucho y me gusta, un 81,2% de aceptabilidad del color para las mismas categorías y un 92,4 % para el olor, indicando estos resultados la buena aceptación del producto cárnico formulado por parte de la población escolar participante. El color del embutido fue el parámetro que presentó la menor aceptabilidad. Esto pudo deberse a la ausencia de nitritos en la formulación del alimento, el cual es el responsable del desarrollo del color rosado característico de los productos cárnicos curados (28); sin embargo, debido a que estudios realizados en animales han demostrado un efecto carcinogénico de los nitritos, en donde sus precursores pueden causar toxicidad en humanos, particularmente en niños (29), se decidió no incluir este aditivo en la formulación, resguardando de esta forma la salud de los niños a quienes va dirigido este producto.

TABLA 5

Evaluación sensorial del producto cárnico

Categoría	Sabor	Porcentaje	Color	Porcentaje	Olor	Porcentaje
Me gusta mucho	232	83,7	198	71,5	230	83,0
Me gusta	21	7,6	27	9,7	26	9,4
Me es indiferente	3	1,1	12	4,3	0	0
Me gusta poco	8	2,9	26	9,4	5	1,8
No me gusta	13	4,7	14	5,1	16	5,8
Total	277	100	277	100	277	100

La cantidad y valor biológico de la proteína, así como el aporte de micronutrientes del producto cárnico formulado, confirman su alta calidad nutricional. A su vez, el producto presenta un elevado porcentaje de aceptabilidad lo que lo convierte en un alimento alternativo para su inclusión en programas de intervención nutricional. Se recomienda realizar ensayos de biodisponibilidad del hierro presente en el producto, y de esta forma estudiar la posibilidad de su administración a una población escolar a fin de evaluar su efecto sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos de escolares con anemia ferropénica.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Humanístico y Científico de La Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) y al Parque Tecnológico Universitario (PTU) por el financiamiento de esta investigación. Así mismo, se agradece la colaboración del Laboratorio de Instrumentación Analítica (LIA) de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia por la asesoría en el análisis espectrofotométrico realizado en este estudio.

REFERENCIAS

1. Anderson L, Dibble M, Mitchell H, Aynbergen H. *Nutrición y Dieta de Cooper*. Nueva Editorial Interamericana, 17a ed. México: México DF, 1987.
2. Instituto Nacional de Nutrición-INN-Fundación Cavendes. *Valores de Referencia de Energía y Nutrientes para la Población Venezolana*. Caracas, 2000.
3. Catricheo R, Sánchez F, Aguayo M, Yáñez E. Desarrollo y evaluación química y nutricional de un alimento infantil a base de lupino dulce, trigo y leche. *Arch Latinoamer Nutr* 1989;39(2):140-9.
4. Márquez E, Benítez B, Méndez N, et al. Características nutricionales de una galleta formulada con plasma sanguíneo de bovino como principal fuente proteica. *Arch Latinoamer Nutr* 1998;48(3):250-5.
5. Lee T, Williams S, Sloan D, Littell R. Development and evaluation of a chicken breakfast sausage manufactured with mechanically deboned chicken meat. *Poultry Sci* 1997;76:415-21.
6. Archile A, Márquez E, Benítez B, Rangel L, Bracho M, Izquierdo P. Calidad nutricional de la carne de pollo deshuesada mecánicamente. *Anal Vzln Nutr* 2000;13(2):88-93.
7. Wismer-Pedersen J. Utilization of animal blood in meat products. *Food Techn* 1979;33(8):76-80.
8. Rangel L, Archile A, Castejón O, Izquierdo P, Márquez E. Utilización del tripolifosfato de sodio como anticoagulante y su efecto sobre las propiedades emulsificantes del plasma. *Rev Cient FCV-LUZ* 1995;5(2):111-6.
9. Benítez B, Barboza Y, Bracho M, et al. Efecto del pH y concentración de las proteínas sobre la propiedad de gelificación de la sangre animal. *Rev Cient FCV-LUZ* 1999;9(3):190-5.
10. Rodas A, Leal M, Arias B, Huerta-Leidenz N, Márquez E. Adición de plasma y paquete globular en la formulación de jamones cocidos. *Rev Cient FCV-LUZ* 1996;6(1):35-9.
11. Márquez E, Barboza Y, Izquierdo P, Torres G. Studies on the incorporation of bovine plasma in emulsion type of meat product. *J Food Sci Techn* 1997;34(4):337-9.
12. Benítez B, Márquez E, Barboza Y, Izquierdo P, Arias B. Formulación y características de productos cárnicos elaborados con subproductos de la industria animal. *Rev Cient FCV-LUZ* 2000;10(4):321-7.
13. Association of Oficial and Analytical Chemist. *Official*

- Methods of Analysis of AOAC. 16th ed. USA, Maryland, 1997.
14. Granadillo V, Cubillán H, Sánchez J, Tahán J, Márquez E, Romero R. Three pressurized mineralization procedures that permit subsequent flame atomic spectrometric determination of Ca, Fe, K, Mg and Zn in bovine blood plasma containing cookies and standard reference materials. *Analytical Chem Acta* 1995;306:139-47.
 15. Lindroth P, Mooper K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Analytical Chem* 1979;51:1667-74.
 16. Torres G, Gómez O, Márquez E. Análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución usando un gradiente binario y un sistema ternario de solventes. *Acta Cient Vzlna* 1994;4(1):312.
 17. SAS PROC GLM. SAS User's Guide: Statistics. 5th ed. SAS Institute INC., Cary NC. 1995.
 18. Márquez E, Izquierdo P, Arias B, Torres G. Efecto de la adición de plasma sanguíneo de bovino sobre la estabilidad de emulsión y contenido proteico de productos cárnicos emulsificados. *Rev Fac Agron-LUZ*. 1995;12:511-22.
 19. Ron M. Lípidos marinos y arterioesclerosis. *Med Intern* 1986;2(4):221-5.
 20. Crosland A, Patterson R, Higman R. Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products, I: Chemical composition. *Meat Sci* 1995;40:289-302.
 21. FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements. Report 724. of a joint FAO/WHO/UNU, Expert Consultation. Geneva:World Health Organization, 1985.
 22. Bracho M, Márquez E, Arias B. Estudio comparativo del contenido de aminoácidos esenciales en sangre de bovino y cerdo. *Rev Cient FCV-LUZ* 2001;9(2):133-8.
 23. Coser A, Jokl L, Vieira E. Effects of temperature of processing and isoleucine fortification on the nutritive value of blood meal. *Arch Latinoamer Nutr* 1977;3:297-309.
 24. Del Río de Reys M, Constantinides S, Sgarbieri V, Eldash A. Chicken blood plasma proteins: physicochemical, nutritional and functional properties. *J Food Sci* 1980;45:17-20.
 25. MacNeil J, Mast M, Leach R. Protein efficiency ratio and levels of selected nutrients in mechanically deboned poultry meat. *J Food Sci* 1978;43:864-5.
 26. Babji A, Froning G, Satterlee L. Protein nutritional quality of mechanically deboned poultry meat as predicted by the C-PER assay. *J Food Sci* 1980;45:441-3.
 27. Young L, Lyon B. The use of heat treated meat in chicken frankfurters. *Poultry Sci* 1973;52:1868-71.
 28. Márquez E, Salazar A. Efecto de diferentes niveles iniciales de nitrito y tipo de fibra en algunas características de productos curados. *Rev Cient FCV-LUZ* 1991;1:35-41.
 29. Havery D, Fazio T. Human exposure to nitrosaminas from foods. *Food Tech* 1985;39:80-5.

Recibido: 13-11-2001

Aceptado: 30-05-2002

NUEVOS LIBROS

Folate and Human Development.

Editores: Edward J. Massaro y John M. Rogers. The Humana Press Inc. 999 Riverview Drive. Suite 208. Totowa, New Jersey 07512. Estados Unidos.

ISBN: 0-89603-936-6. 2002. 359 pags. U.S. \$ 119,00.

Pesticide Residues in Food-2001.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues Evaluations 2001. Part II: Toxicological.

ISBN: 92 4 1665173. 2002. 232 pags. U.S. \$ 54,00.

Palladium.

WHO Environmental Health. Criteria N° 226.

ISBN 92 4 157226 4. 2002. 201 pags. U.S. \$ 32,40.

(WHO. Marketing & Dissemination, 1211 Geneva 27, Switzerland Fax: + 41 22 791 48 75. E mail: publications @ who.int).

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 las 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 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. Utilícense 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 resume el fundamento lógico del estudio u observación. Menciones 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.

Optativamente, 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, ToIheim 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 Al. 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

Mecanografíe 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, utilícense 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.) 0 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.

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición
invita a participar en el

3^{er} Premio Latinoamericano Kellogg's® de Investigación en Alimentación y Nutrición Humana



Categorías y Premios:

PROFESIONAL

US \$ 6,000.00

Placa para el primer autor
y diplomas para
los coautores.

ESTUDIANTE

US \$ 3,000.00

Placa para el primer autor
y diplomas para
los coautores.

El premio se entregará durante el XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición a celebrarse del 9 al 13 de Noviembre del 2003 en el Centro de Convenciones Acapulco en Acapulco, México.

El jurado está integrado por:

Dr. Adolfo Chávez, Inst. Nal. de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México.

Dr. Helio Vannucchi, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Dr. Alejandro O'Donnell, Centro de Estudios Sobre Nutrición Infantil, Argentina.

Dr. Ricardo Uauy, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Chile.

Dr. Fernando Viteri, Universidad de California, Berkeley, EUA.

Para consultar las bases del premio:

www.kelloggs-latino.com

www.slan.org.mx



SLAN

Sociedad Latinoamericana

Kellogg's®

**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



Entrega Especial Expresa
DOCUMENTOS Y ENCOMIENDAS

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...

FUNDACION BENGUA
para la Alimentación y Nutrición
CENTRO DE DOCUMENTACION

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