

ALAN

Volumen 51. N° 3. Septiembre 2001

A R C H I V O S

Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

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

Continuación de Archivos Venezolanos de Nutrición

D E N U T R I C I O N




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

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

Dirección: Archivos Latinoamericanos de Nutrición

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

ENTIDADES PATROCINANTES

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

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION se complace en destacar y agradecer el apoyo económico recibido del CONICIT para la edición sostenida de la revista.
Bajo la responsabilidad del Capítulo Venezolano de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 51

SEPTIEMBRE 2001

Nº 3

Contenido

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Nutrición Humana

Absorption of unlabeled reduced iron of small particle size from a commercial source. A method to predict absorption of unlabeled iron compounds in humans
Horacio González, Concepción Mendoza and Fernando E. Viteri 217

Utilização de diferentes concentrações de ferro por adolescentes grávidas também suplementadas com zinco e ácido fólico
Nadir do Nascimento Nogueira, Dilina do Nascimento Marreiro, Joaquim Vaz Parente,
Sílvia M. Franciscato Cozzolino 225

Growth and hematological studies on Brazilian children of low socioeconomic level
Carlos A. Nogueira-de-Almeida, Rubens G. Ricco, Luiz A. Del Ciampo, Ana Maria de Souza,
José Eduardo Dutra-de-Oliveira 230

Serum lipids and lipoprotein levels in Costa Rican 13-18 year-old teenagers
Rafael Monge-Rojas 236

Bioquímica Nutricional

Absorción de grasa proveniente de tres fuentes dietarias en ratas con diarrea inducida con lactosa
González E.G, Sanchez G., Cioccia A.M., Hevia, P. 244

Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats	
Egle M.A. Siqueira, Sandra F. Arruda; Lucilene M. de Sousa and Elizabeth M.T. de Souza	250
Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina	
Rosimar Regina da Silva, Tânia Toledo de Oliveira, Tanus Jorge Nagem, Aloísio da Silva Pinto, Luiz Fernando Teixeira Albino, Márcia Rogéria de Almeida, George Henrique Kling de Moraes, José Geraldo Pinto	258
Maillard´s reaction in parenteral solutions supplemented with arginine	
M. R. C. G. Novaes, L. A. M. Lima, M. V. Sousa	265
Ciencia de Alimentos	
Changes in protein fractions, trypsin inhibitor and proteolytic activity in the cotyledons of germinating chickpea	
Valdir Augusto Neves and Euclides Joaquim Lourenço	269
O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose	
Admar Costa de Oliveira, Keila da Silva Queiroz, Elizabete Helbig, Soely Maria Pissini Machado Reis, Francisco Carraro	276
Actividad ureásica en productos de soja. Propuesta de un nuevo método	
M.C. Olguin, M.I. Zingale, G.C. Revelant, M.E. Vignale	284
Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark	
Elizabeth Lemos Chicourel, Alice M. Sakuma, Odair Zenebon , Alfredo Tenuta-Filho	288
Tecnología de Alimentos	
Fortificacion y evaluacion de tortillas de nixtamal	
Juan de Dios Figueroa Cárdenas, María Guadalupe Acero Godinez, Nora Lilia Vasco Méndez, Alejandro Lozano Guzmán, Luz María Flores Acosta y Jesús González-Hernández	293
Mezclas legumbre/cereal por fritura profunda de maiz amarillo y de tres cultivares de frejol para consumo “snack”	
María Luz Hurtado P., Berta Escobar A. y Ana María Estévez A.	303
LatinFoods. Composición de Alimentos	
Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central	
Ricardo Bressani, Juan C. Turcios, Luis Reyes y Roberta Mérida	309
INFORMACION PARA LOS AUTORES	314

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 51

SEPTEMBER 2001

Nº 3

Contents

Pages

RESEARCH PAPERS

Human Nutrition

Absorption of unlabeled reduced iron of small particle size from a commercial source. A method to predict absorption of unlabeled iron compounds in humans
Horacio González, Concepción Mendoza[†] and Fernando E. Viteri 217

Utilization of iron at different concentrations on pregnant teenagers also supplemented with zinc and folate
Nadir do Nascimento Nogueira, Dilina do Nascimento Marreiro, Joaquim Vaz Parente,
Sílvia M. Franciscato Cozzolino 225

Growth and hematological studies on Brazilian children of low socioeconomic level
Carlos A. Nogueira-de-Almeida, Rubens G. Ricco, Luiz A. Del Ciampo, Ana Maria de Souza,
José Eduardo Dutra-de-Oliveira 230

Serum lipids and lipoprotein levels in Costa Rican 13-18 year-old teenagers
Rafael Monge-Rojas 236

Nutritional Biochemistry

Fat absorption from three different dietary sources in rats with lactose induced diarrhea
González E.G, Sanchez G., Cioccia A.M., Hevia P. 244

Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats	
Egle M.A. Siqueira, Sandra F. Arruda; Lucilene M. de Sousa and Elizabeth M.T. de Souza	250
Hypocholesterolemic effect of flavonoids naringin and rutin	
Rosimar Regina da Silva, Tânia Toledo de Oliveira, Tanus Jorge Nagem, Aloísio da Silva Pinto, Luiz Fernando Teixeira Albino, Márcia Rogéria de Almeida, George Henrique Kling de Moraes, José Geraldo Pinto	258
Maillard's reaction in parenteral solutions supplemented with arginine	
M. R. C. G. Novaes, L. A. M. Lima, M. V. Sousa	265
Food Science	
Changes in protein fractions, trypsin inhibitor and proteolytic activity in the cotyledons of germinating chickpea	
Valdir Augusto Neves and Euclides Joaquim Lourenço	269
The domestic processing of the common bean resulted in reduction in the antinutritional factors phytates and tannins, in the starch content and in the flatulence factors raffinose, stachiose and verbascose	
Admar Costa de Oliveira, Keila da Silva Queiroz, Elizabete Helbig, Soely Maria Pissini Machado Reis, Francisco Carraro	276
Ureasic activity in soy products. Proposal of a new method	
M.C. Olguin, M.I. Zingale, G.C. Revelant, M.E. Vignale	284
Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark	
Elizabeth Lemos Chicourel, Alice M. Sakuma, Odair Zenebon, Alfredo Tenuta-Filho	288
Food Technology	
Fortification and evaluation of the nixtamal tortillas	
Juan de Dios Figueroa Cárdenas, María Guadalupe Acero Godinez, Nora Lilia Vasco Méndez, Alejandro Lozano Guzmán, Luz María Flores Acosta and Jesús González-Hernández	293
Deep frying snack product of legume/cereal mixture based on corn and three varieties of beans	
María Luz Hurtado P., Berta Escobar A. and Ana María Estévez A.	303
LatinFoods. Food Composition	
Physical and chemical characteristics of industrial nixtamalized maize flour for human consumption in Central America	
Ricardo Bressani, Juan C. Turcios, Luis Reyes and Roberta Mérida	309
INFORMATION FOR AUTHORS	314

Absorption of unlabeled reduced iron of small particle size from a commercial source. A method to predict absorption of unlabeled iron compounds in humans

Horacio González, Concepción Mendoza[†] and Fernando E. Viteri

University of California, Berkeley, California, USA.

SUMMARY. The absorption of a commercial brand of small-particle reduced iron was evaluated in 10 normal subjects. For each subject, the hemoglobin incorporation method was used to measure the true absorption of 60 mg of iron from either ferrous sulfate or ferric ammonium citrate. The iron tolerance test (ITT) was also studied for these two compounds and for reduced iron. This procedure consisted of measuring the area under the curve of plasma iron elevations at specified times for 6 hours, or the peak plasma iron, corrected by the plasma iron disappearance rate obtained from measuring plasma iron at specified times for 4 hours after the slow intravenous injection of 0.4 mg of iron as ferric citrate. Only the ITT was used to measure the absorption of 60 mg of reduced iron. Reference dose iron ascorbate absorption was measured in each subject. The absorption of ferric ammonium citrate and reduced iron was expressed as percent of dose and also as absorption percent of that of ferrous sulfate. Mean % geometric "true absorptions" were 39.0 for reference dose, 10.4 for FeSO₄ and 2.4 for ferric ammonium citrate. The later was 23% that of FeSO₄. By ITT the mean geometric % absorptions were 7.9, 3.7 and 3.2 for FeSO₄, ferric ammonium citrate and reduced iron respectively, or 47 and 41% of that of FeSO₄. We propose that the true absorption of the commercial brand of reduced iron tested was 20% that of FeSO₄ based on the relation between the ITT results of reduced iron and the ITT and true absorption values of ferric ammonium citrate in relation to FeSO₄. The use of this method for measuring absorption of unlabeled iron compounds is discussed.

Key words: Reduced iron, relative absorption, iron absorption methodology, unlabeled iron compounds.

RESUMEN. Absorción de hierro reducido comercial no-marcado y de partícula pequeña. Un método para predecir la absorción de compuestos no-marcados de hierro en humanos. La absorción de una forma comercial de hierro reducido de partícula pequeña se evaluó en 10 sujetos normales. La incorporación de hierro radioactivo en la hemoglobina se utilizó en cada sujeto para medir la "absorción verdadera" de 60 mg de hierro proveniente de sulfato ferroso o de citrato férrico amoniacal. La prueba de tolerancia de hierro (ITT) se usó también en cada sujeto para evaluar la absorción de hierro de estos dos compuestos y del hierro reducido no-marcado. Esta prueba consiste en medir el área bajo la curva de hierro plasmático obtenida por mediciones periódicas por 6 horas subsiguientes a la administración oral de los compuestos de hierro o por el valor pico de hierro plasmático corregidos por la constante de desaparición plasmática del hierro obtenida por mediciones seriadas de hierro plasmático por 4 horas después de la administración endovenosa lenta de 0.4 mg de hierro como citrato férrico. Para medir la absorción de 60 mg de hierro reducido se utilizó únicamente la prueba ITT. Se midió también la absorción de una dosis oral de referencia (3 mg de ascorbato de hierro) en cada sujeto, por incorporación en la hemoglobina. La absorción del citrato férrico amoniacal y la del hierro reducido se expresaron como porcentaje de la dosis administrada y como porcentaje de la absorción de la misma dosis de sulfato ferroso. El promedio geométrico de la "absorción verdadera" de la dosis de referencia fue de 39.0%, la del sulfato ferroso fue de 10.4% y la del citrato férrico amoniacal fue de 2.4%. Esta última fue 23% la absorción del sulfato ferroso. Por la prueba ITT los promedios geométricos de las absorciones fueron 7.9, 3.7 y 3.2% respectivamente para sulfato ferroso, citrato férrico amoniacal y hierro reducido, o sea 47 y 41% de la absorción del hierro de sulfato ferroso por esta prueba. Proponemos que la "absorción verdadera" de la fuente comercial de hierro reducido estudiada fue de 20% la absorción del hierro del sulfato ferroso, basados en la relación entre los resultados de la prueba ITT para el hierro reducido y las del ITT y la "absorción verdadera" para el citrato férrico amoniacal, en relación a ambos resultados para el sulfato ferroso. Se discute el uso de este método para medir la absorción de compuestos de hierro no-marcados.

Palabras clave: Hierro reducido, absorción relativa, metodología de absorción de hierro, compuestos de hierro no-marcados.

INTRODUCTION

Food fortification with iron has increased significantly in the last three decades. The utilization of reduced iron for that purpose in the United States has increased from 72 tons in 1970 to 10,124 tons in 1987. Reduced iron constituted 13.2% and 96.7% of the total amount of iron used in fortification, respectively (1). The use of reduced iron as a fortificant of cereals has continued to increase, but the total amounts are not available (personal communication P. Whittaker and L. A. Mejia, 2000). The absorption of fortification iron is of special interest in order to determine what can be expected in terms of iron nutrition in populations consuming different amounts of iron fortified products using various compounds.

A variety of iron products are used for food fortification purposes, including ferrous sulfate, ferrous lactate, ferrous gluconate, ferric ammonium citrate, ferrous fumarate, ferrous succinate, ferric saccharate, ferric orthophosphate, ferric ammonium orthophosphate, ferric pyrophosphate, EDTA iron, hemoglobin, and elemental iron (electrolytic and carbonyl iron).

The total amount of these iron sources in fortification programs is much less than that of reduced iron (2).

In addition, there is the concept of preventive supplementation of vulnerable groups, and inexpensive and well-tolerated sources of iron could be used for this purpose. Viteri, Ali and Tujague (3) have demonstrated that iron reserves can be progressively increased in childbearing-age women by the administration of 30 weekly iron doses of 60 mg as ferrous sulfate consumed in an interval of 7 months (a total of 30 doses). Initially, 16% had low hemoglobin levels, but by three months of weekly supplementation no woman had hemoglobin (Hb) levels below 125 g/L. The general idea of preventive supplementation is the safe, long-term intake of a weekly iron-folate (and possibly vitamin A and zinc) supplement by vulnerable groups who can not benefit sufficiently from adequate diets, fortified or not (4).

Studies on the absorption of reduced iron have rendered very dissimilar results in relation to the absorption of ferrous sulfate. These results range from 13 up to 148%. The variability in the absorption of different reduced iron products and of other iron compounds was shown by Callender over 30 years ago (5, 6). The variability of results is related to the particle size, surface area, and porosity of reduced iron, which depends on the manufacturing process (7).

The absorption of commercial reduced iron has been difficult because of the inexistence of commercial reduced iron in an isotopic form. Bjorn-Rasmussen and Hallberg (7) as well as Roe and Fairweather-Tait (8) have produced labeled reduced iron in their laboratories trying to mimic the commercial iron sources. The first authors, however, were clear in pointing out the difficulties in predicting the behavior of

commercial reduced iron produced in the laboratory on a micro-scale. Moreover, the majority of the studies on reduced iron absorption have been made adding this type of iron to different foods making it difficult to establish its true availability in relation to that of ferrous sulfate (please see Table 6).

The purpose of the present study was to compare the absorption of an unlabeled commercial source of reduced iron administered alone (without food) at doses compatible with supplementation (60 mg) with those of two other sources of iron whose absorption rates are known: ferrous sulfate and ferric ammonium citrate. Grebe et al. (9) have shown that ferric ammonium citrate is absorbed 22% in relation to ferrous sulfate when both were administered without food. We used the "iron tolerance test" (ITT) to compare the iron absorption from the three compounds and the double radioisotopic absorption of ferrous sulfate and ferric ammonium citrate by hemoglobin incorporation of radiolabeled iron. The absorption of a radiolabeled reference dose of iron ascorbate was also measured in order to adjust the absorptions of the compounds as is customary (10). For comparison purposes, the absorption of ferrous sulfate by either method was considered 100% and that of the other compounds as a proportion of this absorption.

The source of the commercial reduced iron was a reputable company from which we purchased it without the company being aware of the purpose of such purchase to insure the representativeness of the product.

The ITT measured by integrating the area under the serum iron elevation after an oral dose of the compound, unadjusted or adjusted by the iron disappearance constant after an intravenous iron dose, has been used to measure iron absorption before the development of isotopic methods to determine the «true absorption» or «retention of iron». The true absorption has been measured by the incorporation of radioisotopic iron to circulating hemoglobin; retention has been measured by whole body counting (11). Many of the results from the ITT are considered imprecise given that the individual values obtained correlate poorly with the other two methods (12). However, the mean and ranges of absorption in groups of subjects obtained by the ITT are acceptable when compared to the other methods if adjustments for disappearance rates are used and the absorptions are reported as percent of the ferrous sulfate standard (11, 13-15).

On the other hand, Heinrich (13) and Heinrich and Fischer (14) validated the results of the tolerance test by comparing them to those of whole body counting as a reference method. They, as well as Ekenved (11) were able to obtain correlation coefficients in the order of 0.88 between whole body radioactivity and integrated areas under the serum iron curve or with the peak increments, adjusted or not by disappearance

rates, when different iron doses were given to the same subjects.

The utilization of both the ITT and the radioiron incorporation into Hb of a high and a low bioavailability iron compounds (ferrous sulfate and ferric ammonium citrate, respectively) and the ITT for estimating the absorption of non-radiolabeled reduced iron in relation to the previous compounds, constitutes a new approach to estimating the «true absorption» of reduced iron.

MATERIALS AND METHODS

Healthy adult volunteers between the ages of 18 and 65 years who responded to a public call in the Berkeley, California community were invited to participate in the study. All the procedures from recruiting to the performance of the study were approved by the Committee of the Protection of Human Subjects (CPHS) as well as by the Radiation Safety Committee of the University of California at Berkeley.

Exclusion criteria included pregnancy or the possibility of becoming pregnant within two years, breast feeding, metrorrhagia, gastrointestinal symptoms, suspicions of intestinal malabsorption, chronic inflammatory conditions, current or previous use of therapeutic iron in the last six months, recent blood donation and probability of not being able to finish the full study.

Twenty volunteers entered the study and only ten completed it. The volunteers arrived at the laboratory for screening procedures, signature of informed consent and for scheduling of activities to be undertaken at the penthouse of Morgan Hall at the university campus. Their health status was evaluated and for menstruating women the characteristics of their cycles and birth control methods. They were instructed to fill out a diet history questionnaire and to maintain their usual diet during the whole study period, not to take any supplements except those administered by us and to keep a record of foods consumed the day prior to each test.

The reduced iron administered was hydrogen-reduced 99.8 purity, produced initially by the Domfer process utilizing high pressure water jets (16). Its absorption was estimated by the ITT. This test consisted of measuring the area under the plasma iron curve obtained by repeated venous blood sampling for 6 hours after the oral ingestion of 60 mg of reduced iron in a gelatin capsule accompanied by 125 ml of water. The procedure was performed after an overnight fast. The area under the plasma iron curve was adjusted by the serum iron disappearance rate obtained by the slow intravenous administration of 0.4 mg of iron citrate in a peripheral vein of one arm. Repeated blood samples were obtained from a catheter inserted in a peripheral vein in the other arm. The identical ITT procedure was also performed for ferrous sulfate and ferric ammonium citrate. However,

these last two compounds were also labeled with either ^{55}Fe or ^{59}Fe . Iron absorption from these two compounds was also measured by their radioactive incorporation into hemoglobin two weeks later. The absorption of a reference dose of 3 mg of iron ascorbate (15 mg of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 25 mg Ascorbic acid) administered as a solution in 250 ml of orange juice, was also measured by its incorporation into hemoglobin. In essence, all subjects underwent the 5 following procedures: an intravenous administration of iron citrate; the oral ingestion of the three compounds being tested (ferrous sulfate, ferric ammonium citrate, and commercial reduced iron), and the oral ingestion of the reference iron ascorbate dose. The sequence of these five events was randomly assigned. In half the subjects, three of these events took place at the start of the study and the other two followed two weeks later, after blood was obtained to measure radiolabeled iron incorporation into Hb. In the other half two events took place initially and the other three two weeks later. Each event was separated from the previous one by two days. When two radioactively labeled compounds were administered in sequence, one was labeled with ^{55}Fe and the other with ^{59}Fe . Only reduced iron was unlabeled (Table 1). The radioactivity doses administered were 0.3-0.4 μCi (11.1 - 14.8 mBq) intravenously and 1.0 μCi (37 mBq) of ^{59}Fe orally, or 0.7 μCi (25.9 mBq) intravenously and 2.0 μCi (74 mBq) orally of ^{55}Fe . Serial 5 ml blood samples were obtained 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 minutes after the end of the intravenous infusion, and at 0, 30, 60, 90, 45, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes after the oral ingestion of iron.

The blood sampling catheter was kept open between samples by the infusion of 1 ml of saline with 5 u of heparin/100 ml through a 3-way valve. The contents of the valve and the catheter were aspirated before blood sampling for each point in the ITT until about 0.5 ml of blood was recovered. This aspirate was discarded and the 5 ml study sample was subsequently obtained.

A total of 5 doses of 60 mg of ferrous sulfate were also administered to the subjects in order to replace the iron drawn in the five sessions where 55 ml of blood were drawn. Single doses were to be ingested at home by the subjects at the end of the test day, that is at least two days prior to any test.

The following biochemical determinations were performed in each basal sample (time 0): blood hemoglobin, serum iron, total iron binding capacity (TIBC), and plasma ferritin. Percent saturation of TIBC was calculated. Blood hemoglobin was also measured in every sample in order to correct for possible dilution by adjusting all of the values to the basal hemoglobin level.

Blood hemoglobin was measured by the HemoCue System (HemoCue Inc., Angelholm, Sweden). Plasma ferritin was measured by the Spectro Ferritin MT Kits (Ramco Laboratories, Houston, Texas) standardized against WHO standards. Plasma iron and TIBC were measured by the

methods published by INACG (17). Iron absorption by incorporation into hemoglobin was measured by liquid scintillation counting (18).

TABLE 1
Schematic presentation of the schedule of a subject
in one group[⊗]

Procedure	Study days									
	-10	1	4	7	//	21	25	29	//	43
Blood I (Basal)	√									
*Fe-Citrate I. V.		√A								
*Ferrous sulfate P. O.			√B							
Reduced iron P. O.				√B						
Blood II							√			
*Ferric Ammonium Citrate P. O.							√B			
*Iron Ascorbate P. O. (Reference dose)								√B		
Blood III										√

⊗ Subjects in the other group had two events between blood I and blood II and three events between blood II and blood III. In either case, events were rotated randomly.

* Indicates either ⁵⁵Fe or ⁵⁹Fe radiolabeled compound

A: Five ml of blood obtained before the I. V. infusion and at 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 minutes after the end of the infusion.

B: Five ml of blood obtained before the oral dose and at 30, 60, 90, 45, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes after the ingestion of the capsule.

Bloods I, II and III: 30 ml of blood for measurement of radioactivity incorporated into hemoglobin.

The solubility of ferrous sulfate, ferric ammonium citrate, and reduced iron was measured as indicated by Bjorn-Rasmussen and Hallberg (7), and its particle size was measured in triplicate in a suspension of saline:glycerol mixture (60/40) using a Z1, single channel Coulter particle size counter.

Statistical analyses were done using a SPSS package (19) and a SUN Enterprise 5000 server with four 336 Mhz ultraSPARC-I processors (CPU) at the University of California, Berkeley. The test used was repeated measures ANOVA using iron compound, method and sequence as grouping factors and absorption as test factor and Tukey's follow-up test with a $p < 0.05$ as a level of significance.

RESULTS

The particle size determinations of reduced iron, counted in quintuplicate in a suspension medium consisting of 20% glycerol in saline solution, showed that 0.56% of particles

fell between 10 and 20 μm , 2.62% fell between 5-10 μm , and 96.80% fell below 5 μm . The solubility of the compounds gave the following results: ferrous sulfate 100%, ferric ammonium citrate 91%, and reduced iron 21%. A sample of electrolytic iron from the same manufacturer yielded 56% solubility by the same method (7).

The characteristics of the subjects that completed the study are shown in Table 2. The subjects that did not complete the study were no different from those who completed it (data not presented). Only one woman in the group that did not complete the study could be regarded as anemic (Hb <120 g/L) but 6 had low Hb (<125 >120 g/L) 4 among those who completed the study and 2 among those who did not.

TABLE 2
Characteristics of the subjects who completed the study

Subject No.	Age (years)	Sex	Weight (kg)	Height (m)	Body Mass Index	Hemoglobin (g/L)
1	20	F	63.6	1.66	23.08	149
2	21	F	65.8	1.68	23.31	120
3	21	F	54.5	1.64	20.26	124
4	18	M	72.6	1.72	24.54	145
5	21	F	61.2	1.64	22.75	137
6	24	M	68.1	1.67	24.41	155
7	18	F	81.7	1.54	34.44	120
8	19	M	83.9	1.87	23.99	155
9	19	F	76.2	1.54	32.13	135
10	20	F	68	1.72	22.98	121
Mean	20.1		69.56	1.67	25.15	136

All the subjects ate a varied diet including meat and fish which contributed, on average, 0.7 mg of heme iron/day. Few of the subjects studied consumed coffee or tea with their meals. Most drank bottled sodas and fruit flavored drinks with meals. The basic food components of their diet were rice, pizza, chicken, hamburger, eggs, bread, tortillas, pasta and a small variety of fruits and vegetables. Our semiquantitative estimates of total iron intake indicate an average of 11.1 mg/day among the women studied and of 14.6 mg/day among the men. The diets consumed by the subjects before each test day did not differ from their usual intake (data not shown). Five of the women studied were on oral anovulatory pills and the rest were sexually inactive. None reported having notoriously abundant periods.

Table 3 shows the results of plasma iron, TIBC, percent saturation of TIBC, and ferritin in all basal samples of the subjects who completed the study. All the mean values in the table are within the normal ranges. However, three subjects with low or borderline Hb values presented very low ferritin levels but except for case No. 7 the % saturation of TIBC was above 30. This subject also presented a serum iron level suggesting iron deficiency.

TABLE 3
Basal values for plasma iron, TIBC, % saturation of TIBC and plasma ferritin among the subjects that completed the study

Subject No.	Plasma Fe $\mu\text{g/L}$	TIBC $\mu\text{g/L}$	TIBC saturation %	Plasma ferritin $\mu\text{g/L}$
1	86	280	30.8	37.2
2	121	243	49.8	1.6
3	120	370	32.3	2.6
4	92	273	33.9	19.1
5	90	286	31.6	27.8
6	82	288	28.4	78.6
7	62	254	22.2	7.1
8	60	251	23.9	39.3
9	95	310	30.7	88.3
10	79	279	28.3	55.4
Mean	86.5	281.47	30.49	
S. D.	20.4	36.39	7.49	
Geometric mean				19.57
+ 1 S. D.				80.64
- 1 S. D.				4.76

The plasma disappearance rate was $-1.096\%/minute$ ($SD=0.064\%$, $SE=0.020\%$). As expected, the rates were faster in iron deficient than in iron sufficient subjects, but given the few subjects studied the correlation between disappearance rates and iron status (Hb, plasma ferritin and % saturation of TIBC) did not reach statistical significance. The disappearance constants were similar to those reported in ferokinetic studies in the literature (10).

Table 4 presents the results of basal plasma ferritin and the percent absorption of ferrous sulfate, ferric ammonium citrate and reference dose measured by the isotopic method. The geometric means of plasma ferritin and reference dose absorption are indicative of the marginal iron deficiency of the population studied. The absorption of ferric ammonium citrate was 23% of that from ferrous sulfate. The high negative correlation between plasma ferritin and reference dose absorption ($r=-0.76$, Figure 1) was what would be expected. However, it is surprising that there was no negative correlation between plasma ferritin and ferrous sulfate absorption while it was present with ferric ammonium citrate ($r=-0.45$). There was no significant correlation either between ferrous sulfate and ferric ammonium citrate absorption. Figure 1 also indicates that there is no correlation between \ln plasma ferritin and \ln reference dose absorption when the former is higher than 3.33, corresponding to a plasma ferritin level of $28 \mu\text{g/L}$ in this series.

TABLE 4
Basal ferritin values and % absorption of radiolabeled ferrous sulfate, ferric ammonium citrate and reference dose, measured by Hb radioiron incorporation

Subject No.	Plasma ferritin $\mu\text{g/L}$	Ferrous sulfate Absorption %	Ferric ammonium citrate absorption %	Reference dose absorption %
1	37.2	9.15	4.52	24.39
2	1.6	13.09	13.09	96.69
3	2.6	11.36	9.87	51.97
4	19.1	8.61	0.94	62.69
5	27.8	10.97	2.68	24.37
6	78.6	4.5	0.55	35.09
7	7.1	11.61	8.99	72.31
8	39.3	9.06	4.89	14.86
9	88.3	22.99	1.99	38.36
10	55.4	10.6	0.56	30.95
Geometric mean	19.57	10.39	2.35	38.97
+ 1 S. D.	80.64	15.48	6.75	68.71
- 1 S. D.	4.76	6.96	0.82	21.95

NOTE: Statistically significant correlations were found between plasma ferritin and reference dose absorption ($r=-0.76$) and between plasma ferritin and ferric ammonium citrate absorption ($r=-0.45$).

FIGURE 1

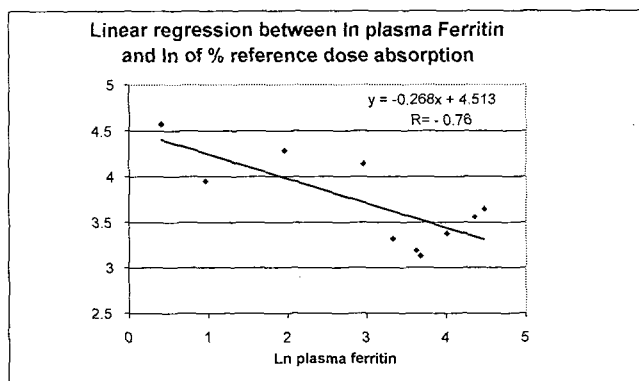


Table 5 shows the percent absorption of reduced iron, ferrous sulfate, and ferric ammonium citrate estimated either by the area under the plasma iron curve or by peak elevation in the ITT. The results demonstrate the superiority of ferrous sulfate over ferric ammonium citrate in terms of iron absorption, as was the case for radioiron incorporation into Hb (Table 4); the similarity of mean absorption results by the radioiron incorporation and the ITT, and the almost identical results obtained by both methods of estimating absorption by the ITT (correlation coefficients between estimates by area under the plasma iron curve and peak iron values above basal range between 0.97 and 0.98).

TABLE 5

Percent absorption of ferrous sulfate, ferric ammonium citrate and reduced iron estimated by the «tolerance test» considering both the area under the curve and the peak elevation from baseline plasma values

Subject No	Ferrous sulfate absorption by area	Ferrous sulfate absorption by peak	Ferric ammonium citrate absorption by area	Ferric ammonium citrate absorption by peak	Reduced iron absorption by area	Reduced iron absorption by peak
1	8.1	7.7	3.63	3.55	2.52	2.16
2	8.02	7.7	3.63	3.06	0.67	0.41
3	6.9	6.6	3.99	3.65	1.69	1.52
4	11.93	11.06	8.31	7.93	6.41	6.33
5	7.31	7.36	5.49	5.23	4.58	3.39
6	6.76	5.21	5.08	4.62	4.28	2.23
7	9.04	8.2	2.5	2.36	4.67	3.93
8	14.14	14.13	1.18	0.56	6.13	5.48
9	8.21	7.5	5.91	5.66	4.35	3.6
10	5.01	4.7	4.6	4.33	8.93	7.36
Geometric mean	8.24	7.61	3.97	3.46	3.63	2.86
+ 1 S.D.	11.02	10.48	6.82	7.1	7.76	6.69
- 1 S.D.	6.17	5.52	2.32	1.68	1.7	1.22

NOTE: Mean percent absorption of ferric ammonium citrate and reduced iron expressed as percent of that of ferrous sulfate yield the following results:

	BY AREA
Ferric ammonium citrate	Reduced iron
48 % (+1 S.D.:96; -1S.D.:24)	44 % (+ 1 S.D.:97; -1 S.D.:20)
	BY PEAK
45% (+1 S.D.:115; -1S.D:18)	37% (+ 1 S.D.:88; -1 S.D.:16)

The correlation coefficient between the two ways of estimating absorption were:
For ferrous sulfate: 0.97; for ferric ammonium citrate : 0.98 and for reduced iron: 0.97.

DISCUSSION

Four of the seven women studied presented hemoglobin levels lower than 125 g/L. Three of them had plasma ferritin values lower than 12 µg/L. However, the percent saturation of TIBC was higher than 16% in all cases (mean 30.5%). Therefore, these three subjects were iron depleted based on the presence of low plasma ferritin values (10) and possibly were approximating an iron deficient status. It is evident that the average diet consumed by the students was poor in terms of iron intake.

The curve that is drawn by iron plasma levels expresses three events: 1) the amount of iron absorbed at a given time during the initial phase of iron absorption (21); 2) the velocity of transfer of intestinal iron to the plasma pool and 3) its disappearance due to its capture by different tissues. Importantly, neither the % saturation of TIBC or the unbound TIBC influenced the plasma iron increments per mg of iron absorbed (11). On the other hand, the absorption measured by radioisotopic iron incorporated into hemoglobin in 2 weeks

time only reflects a final point which is when the iron is utilized in hemoglobin synthesis. In other words, the two methods used in this study measure different events of iron absorption and metabolism. In spite of this, the mean results of percent absorption of either ferrous sulfate or ferric ammonium citrate do not differ by the method utilized. Similarly, the area under the curve and the peak values of plasma iron levels corrected by disappearance rates are almost equal for each compound studied. These results are somewhat unexpected given the differences in the events they represent. This fact explains why on an individual basis they do not correlate. The experience of other investigators is similar (11, 12, 15). Thus, the ITT is not a useful method to determine individual amounts of absorbed iron from a given compound. However, it can be useful in comparing the relative absorption of different iron compounds or different doses of the same iron source in the same individual as well as in a group of individuals (11, 15, 22).

The results obtained regarding the absorption of the reference dose, ferrous sulfate and ferric ammonium citrate

are similar to those reported by other authors (9, 10, 11, 13, 14).

As has also been described in the literature, we found a negative correlation between plasma ferritin values and the percent of reference dose absorbed (10). However, the correlation between the plasma ferritin level or reference dose absorption and the percent absorption of 60 mg of iron administered as ferrous sulfate by the ITT was positive but failed to reach significance. We expected to find a greater absorption value in subjects exhibiting iron depletion and as a consequence, higher plasma iron levels after dose ingestion. However, this was not the case. It is possible that these results could be due to a greater disappearance rate of plasma iron. This factor could also alter a possible correlation between reference dose absorption and the values obtained by the ITT.

It is interesting to note that the values obtained for iron absorption by the ITT of ferrous sulfate had a very narrow range. On the other hand, the percent absorption by the ITT of ferric ammonium citrate, with a range of values ten times greater, had a significant correlation with ferritin ($r=0.45$). Still, the correlation between reference dose absorption and that of ferric ammonium citrate also failed to reach significance.

The iron absorption from 60 mg of iron as ferrous sulfate

(10%) are in the same range as those reported by Heinrich (14) for subjects whose reference dose absorption was 39%. Also, the relative absorption of iron from ferric ammonium citrate in relation to ferrous sulfate iron measured by Hb radioiron incorporation was 23%, almost identical to that reported by Grebe et al. (9). The relative absorption of ferric ammonium citrate by the ITT, however, is 47% of that of ferrous sulfate. These results suggest that the «true absorption» of reduced iron is near 20 % of that of ferrous sulfate.

The relation between particle size and percent solubility of reduced iron were also within the same range as those reported by Bjorn-Rasmussen (7), and the absorption of reduced iron in relation to that of ferrous sulfate measured by the same method demonstrates that the commercial product studied was only 46% of that of ferrous sulfate by the ITT.

Table 6 shows the different percents of iron absorption reported in the literature utilizing different compounds and methods. Hoglund and Reizenstein's results with low particle size reduced iron administered in conjunction with low extraction bread gave almost identical results to our own when related to FeSO₄ absorption even though conditions and amounts given are very different in the two studies (21).

TABLE 6
Published results on reduced iron absorption by different methods in humans*

Dose (mg)	Administration	Absorption as % of FeSO ₄ or of Ferric Ammonium Citrate	Reference	Notes
1	bread	130 % (FeSO ₄ dose :Fe 3 mg)*	Roe M, et al.1999 (8)	N=10. Stable isotopes. Fecal monitoring. PSRI:50-20μ (lab. prep.)
10	Water (ITT)	120 % (FeSO ₄ dose:Fe3mg)	Roe M, et al1999 (8)	N=3. 10-100μ. Commercial
1	bread	12% (arithmetic mean (Reference dose 5 mgFe ascorbate)	Callender S, et al. 1968 (5)	N=6. WBC. PSRI ? . Lab. prep.
4	Swedish average meal	10% ((Reference dose 5 mg: Fe ascorbate)	Bjorn-Rasmussen,et al. 1977 (7)	N=19. WBC, IiHb PSRI 91% ≤ 7 (Lab. prep., and commercial)
11.3	Swedish average meal	20% (Reference dose 3 mg: Fe ascorbate)	Bjorn-Rasmussen, et al. 1977 (7)	N=18. WBC, IiHb PSRI 91% ≤ 7 (Lab. prep., and commercial)
40	bread (ITT)	31.5% (FeSO ₄ dose Fe 40 mg with brea	Vellar O, et al. 1968 (22)	N=18 ITT 2 hrs after intake. HR: ? (Lab prep.)
1	bread	45 % (FeSO ₄ : Fe 1 mg with bread)	Hoglund S et al. 1969 (21)	N=13. WBC PSRI: 97% ≤ 5 μ (Lab. prep.)
1	bread	15 % (FeSO ₄ : Fe 1 mg with bread)	Hoglund S et al.1969 (21)	N=9. WBC. PSRI:71% 25 μ (Lab. prep.)
60	water (ITT)	7 - 9 % (Fe ascorbateFe3 38 - 44 % (FeSO ₄ : Fe 60 mg with water) 83 - 91 % (Ferric Ammonium Citrate: Fe 60 mg with water)	Present study	N=10. PSRI: 97 % ≤ 5 μ Commercially prep.

* WBC: Whole Body Counter. IiHb: Iron Incorporation into Hemoglobin. PSRI: Particle Size Reduced Iron. ITT: Tolerance test

**Fe absorption from FeSO₄ was 27 % of that of the reference dose. This is the expected effect of differences in iron doses administered: 3 mg as iron ascorbate and 60 mg as FeSO₄ (13).

*Results of these studies are suspect, possibly because of methodological problems.

In conclusion, we propose that by using the combined ITT of unlabeled and radiolabeled compounds and radioiron incorporation into Hb, the «true absorption» of unlabeled reduced iron can be estimated in relation to the absorption of FeSO₄. By this technique, a common brand of commercial small particle-size reduced iron was absorbed at rates similar to those of ferric ammonium citrate (3.72 and 3.27% respectively) representing 47 and 41% of ferrous sulfate iron respectively by the ITT. However the «true absorption» of the reduced iron tested is probably near 20% of that of ferrous sulfate given the «true absorption» of ferric ammonium citrate. In order to accept this extrapolation we have to assume that, under the conditions of this study, once the iron from any nonheme iron source enters the enterocyte its behavior is similar in terms of transport and utilization in erythropoiesis. Current knowledge of iron absorption and metabolism of nonheme iron supports this assumption (23).

The ingestion of 60 mg of reduced iron on an empty stomach or between meals would be similar to ingesting about 12mg of iron contained in 60 mg of FeSO₄.7H₂O (that has 20% iron). The response to the administration of this brand of reduced iron would be similar to that of similar doses of ferric ammonium citrate. Reduced iron is less reactive than FeSO₄ and possibly is better tolerated.

These preliminary results presented may open the door to the use of the method described to measure the absorption of unlabeled compounds (such as different brands of commercial reduced iron) as a fortificant in meals that differ in iron bioavailability.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank the volunteers for their commitment to the study and to Dr. Mark Hudes for his assistance in the statistical analysis of the data. Special thanks go to the Fulbright program for the support of Dr. Gonzalez during his stay at the University of California at Berkeley.

REFERENCES

- Whittaker P. Iron and Zinc interaction in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68 (suppl): 442S-6S.
- Hurrell R. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutrition Reviews* 1997; 55: 210-222.
- Viteri FE, Ali F, Tujague J. Long-term weekly iron supplementation improves and sustains nonpregnant women's iron status as well or better than currently recommended short-term daily supplementation. *J Nutr.* 1999;129:2013-2020.
- Viteri FE. Prevention of iron deficiency. In: *Micronutrient Deficiencies: A Toolkit for Policymakers and Public Health Workers.* Eds. CP Howson, E Kennedy, A. Horwitz. Institute of Medicine, National Academy Press, Washington, D. C. 1998; pp 45-102.
- Callender S, Warner T. Iron Absorption from bread. *Am J Clin Nutr.* 1968; 21:1170 - 1174.
- Callender S. Food iron utilization. In Hallberg L, Harwerth H, Vannotti A. Iron deficiency. Pathogenesis. Clinical aspects. Therapy. Academic Press Inc. (London) LTD. 1970. pp. 75-85.
- Bjorn-Rasmussen E, Hallberg L, Rossander L. Absorption of «fortification» iron: Bioavailability in man of different samples of reduced Fe, and prediction of effects of Fe fortification. *Br J Nutr.*1977;37: 375-88. .
- Roe M, Fairweather-Tait S. High bioavailability of reduced iron added to UK flour. *The Lancet* 1999;353:1938-1939.
- Grebe G, Martinez-Torres C, Layrisse M. Effect of meals and ascorbic acid on the absorption of a therapeutic dose of iron as ferrous and ferric salts. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental.* 1975;17: 382 - 97.
- Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD and Finch CA. Iron metabolism in man. 1979. Oxford, Blackwell.
- Ekenved G, Norrby A and Sölvell L. Serum iron increase as a measure of iron absorption. Studies on the correlation with total absorption. *Sacnd J Haematol.* 1976 Suppl. 28:31- 49.
- Bothwell TH, Pirtzio-Biroli G and Finch CA. Iron Absorption. I. Factors influencing iron absorption. *J Lab Clin Med.* 1958;51:24-36.
- Heinrich H. Intestinal iron absorption in man - Methods of measurement, dose relationship, diagnostic and therapeutic applications. In Hallberg L, Harwerth H, Vannotti A. Iron deficiency. Pathogenesis. Clinical aspects. Therapy. Academic Press Inc. (London) LTD 1970; 213-296.
- Heinrich HC and Fischer R. Correlation of postabsorptive serum iron increase and erythrocyte-⁵⁹Fe-incorporation with the whole body retention of absorbed ⁵⁹Fe. *Klinische Wochenschrift,* 1982, 60:1493-1496.
- Wienk KJ, Marx JJ and Beynen AC. The concept of iron bioavailability and its assessment. *European J Nutr.* 1999;38:51-75.
- Roy LG. Production of iron powder by the Domfer Process. In: *Metals Handbook, 9th edition.* Powder Metallurgy of the American Society for Metals, 1984;pp 89-92.
- International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG). Measurements of iron status. The Nutrition Foundation, Inc. 1985.
- Viteri FE, Kohaut B. Improvement of the Eakins and Brown method for measuring ⁵⁹Fe and ⁵⁵Fe in Blood and other iron-containing materials by liquid scintillation counting and sample preparation using microwave digestion and ion-exchange column purification of iron. *Analytical Biochemistry* 1997;244:116-123.
- SPSS for UNIX, release 6.13 (Solaris2.X). SPSS Inc., Chicago, Illinois, release Jan. 2001.
- Hallberg L and Sölvell L. Absorption of a single dose of iron in man. *Acta Med Scand.* 1960; Supple. 358:19-42.
- Hoglund S and Reizenstein P. Studies in iron absorption .V. Effect of gastrointestinal factors on iron absorption. *Blood* 1969; 34:496-504.
- Vellar O, Borchgrevink C, Natvig H. Iron-fortified bread. Absorption and utilization studies. *Acta Med Scand* 1968;183:251-256.
- Wessling-Resnick M. Iron transport. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:129-151.

Recibido: 09-02-2001

Aceptado: 10-07-2001

Utilização de diferentes concentrações de ferro por adolescentes grávidas também suplementadas com zinco e ácido fólico

Nadir do Nascimento Nogueira, Dilina do Nascimento Marreiro, Joaquim Vaz Parente, Sílvia M. Franciscato Cozzolino

Universidade de São Paulo - SP- Brasil, Universidade Federal do Piauí - Piauí - Brasil

RESUMO. A adolescente grávida é considerada nutricionalmente de risco, tendo em vista que a maioria delas ainda se encontra em processo de crescimento e de desenvolvimento, além de haver demanda extra sobre o seu organismo, para o crescimento e desenvolvimento do feto (1). Ferro, zinco e ácido fólico são nutrientes essenciais que com frequência apresentam-se deficientes em dietas de adolescentes. Além disso, no que diz respeito às quantidades recomendadas desses nutrientes durante a gravidez, e ainda sobre as possíveis interações entre os mesmos, os dados disponíveis são limitados e merecedores de maiores investigações. Este estudo foi conduzido numa maternidade pública em Teresina -Piauí, Nordeste do Brasil, com o objetivo de se investigar o efeito do uso de diferentes concentrações de ferro (sulfato ferroso) 80mg e 120mg, e constantes em ácido fólico (250µg) e zinco (5mg) na resposta hemoglobínica (concentração de hemoglobina) e reserva de ferro (ferritina plasmática) de adolescentes grávidas suplementadas com os citados nutrientes, iniciando o uso dos suplementos a partir do período de 16 a 20 semanas de gravidez até o parto. Os resultados mostraram que a utilização de 80mg e 120 mg de ferro por adolescentes grávidas provocou similar melhora na resposta hemoglobínica, porém, sem significado estatístico ($p < 0,05$), não refletindo nas reservas orgânicas do mineral.
Palavras chave: Adolescentes grávidas, crianças, suplementação.

SUMMARY. Utilization of iron at different concentrations on pregnant teenagers also supplemented with zinc and folate. The pregnant teenager is considered at nutritional risk specially due to the fact that most of them still growing and developing. Therefore the demands of pregnancy compete with those of growth causing an extra need for her and the fetus (1). Iron, zinc and folate are essential nutrients that are frequently low on the teenagers diet. Besides that there is not much specific information available about these nutrient recommendations and their interaction among each other. The data available is limited and demands more investigation. This study was conducted at a Public Maternity Hospital located at Teresina, Piauí, Brazil. The main objective of this study was to investigate the effect of different concentrations of iron supplementation (80 and 120 mg of ferrous sulfate) together with folate (250 µg) and zinc (5 mg) on the hemoglobin concentration and iron stores (plasma ferritin) of pregnant adolescents. The supplementation was done from the 16th to 20th weeks of gestation until delivery. The data founded proved that either 80 mg or 120 mg of iron supplements had similar effect on the improvement of hemoglobin concentration although results showed no statistical significance.
Key words: Newborn, pregnancy, adolescent, teenager, supplementation.

INTRODUÇÃO

Da década de cinquenta aos dias atuais, estudos com o apoio da Organização Mundial da Saúde, têm revelado ser alta a prevalência de anemias nutricionais no mundo. A deficiência de nutrientes hematopoéticos nos indivíduos em geral e, em especial, entre mulheres grávidas e crianças, tem sido apontada como importante causa desses achados. De acordo com esses dados, a deficiência de ferro é a mais importante deficiência nutricional do mundo. Quando a anemia é usada como um indicador de deficiência de ferro, estima-se que cerca de 30% a 60% das mulheres e crianças, de países em desenvolvimento, sejam deficientes desse mineral (2).

Estas informações são apoiadas por outros autores (3,4) os quais acrescentam serem essas anemias de maior frequência em mulheres com dietas inadequadas e que não

recebem durante o pré-natal, suplementos de ferro e folato. Folato e ferro são nutrientes essenciais que com frequência estão deficientes em dietas de grupos populacionais. Ambos são necessários para o desenvolvimento normal do sistema hematopoético, bem como em numerosos processos metabólicos. Desta forma, a deficiência de cada um, ou de sua combinação, poderá resultar na anemia, com conseqüências fisiopatológicas associadas (5).

A suplementação associada de ferro e ácido fólico constitui a principal estratégia para o controle da anemia na gravidez e, mecanismos de aplicação desta estratégia têm sido revisados nos últimos anos, afim de se alcançar o controle efetivo da anemia deste grupo populacional (6). Por outro lado, são também conhecidas as interações metabólicas observadas quando do uso excessivo de ferro e de folato sobre o metabolismo do zinco (7,8).

No que se refere à interação específica entre minerais, uma revisão da literatura sobre as consequências da interação ferro-zinco na nutrição humana, traz que os efeitos prejudiciais ao estado nutricional do zinco são decorrentes do consumo excessivo de ferro inorgânico, de origem alimentar ou na forma de suplemento (9).

Estudo conduzido em São Paulo sobre interação ferro-zinco (10) mostra que a biodisponibilidade do zinco diminuía com a suplementação de ferro, principalmente quando a concentração deste era da ordem de 4 vezes superior às necessidades.

Nessa linha de pesquisa, outros autores (11) encontraram em grávidas, fazendo uso de suplementos de ferro de 90 mg/dia, uma diminuição na concentração de zinco no soro de 7% a 15%. Em adolescentes grávidas, foi também verificado que, o consumo de 18 mg/dia foram suficientes para reduzir as concentrações de zinco no soro em 30% a 40% (12).

A nutrição da mulher durante a gravidez e a lactação sempre foi assunto de interesse e um período em que se recomenda a suplementação farmacológica. Durante estes períodos, as necessidades nutricionais sofrem consideráveis mudanças. E, embora a suplementação farmacológica não possa ser uma alternativa válida para todas as situações, ela deverá ser aplicada naquelas de risco nutricional, quando a contribuição alimentar é insuficiente (13).

A anemia por deficiência de ferro durante a gravidez tem sido associada a várias condições adversas, incluindo o elevado risco de mortalidade materna durante o período perinatal, o baixo peso ao nascer e partos pré-termos (2,4). De acordo com o UNICEF (1998) em regiões como África e Ásia, a anemia foi identificada como um fator interveniente, se não a causa principal de 20% a 30% de todas as mortes maternas, no pós-parto (14).

A gravidez no período da adolescência tem sido motivo de atenção e de pesquisas nos últimos anos onde se tem visto aumentar de forma considerável o número de gestantes com idades cada vez menores. A taxa de fecundidade total no país está em declínio, apresentando uma redução em todas as faixas etárias, exceto entre 15 e 19 anos. A Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde de 1996 mostrou que, no Brasil, 18% das adolescentes nesta faixa etária, já tinham pelo menos um filho ou estavam grávidas (15).

Dados do Estado de São Paulo mostram que a proporção de mães com 15 anos aumentou 300% entre 1970 e 1980, sendo que, entre aquelas com 16 anos, o aumento foi de 126% (16). Estudo mais recente realizado também em São Paulo demonstra que, mães com menos de 20 anos são responsáveis por 17% dos nascimentos deste Estado (17).

Em face da crescente ocorrência de gravidez durante a adolescência, vários estudos vêm sendo conduzidos com este grupo. Porém, os aspectos mais estudados têm sido os de ordem biológica e psicossociais. Quanto aos nutricionais e

suas implicações sobre o conceito, os dados são ainda bastante limitados. Com base nas informações acima este estudo foi conduzido considerando-se dois aspectos básicos: a elevada prevalência de anemia em mulheres grávidas, e em particular entre as adolescentes, e ainda, a grande discussão acerca das quantidades recomendadas para os nutrientes ferro, zinco e ácido fólico, durante este período.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido com 74 adolescentes grávidas, com idade entre 13 e 18 anos, que faziam parte da demanda espontânea do serviço de pré-natal do Instituto de Perinatologia Social do Piauí- Maternidade Dona Evangelina Rosa, localizada em Teresina-Piauí, Nordeste do Brasil e encontravam-se no início da pesquisa entre 16 e 20 semanas de gravidez. Para seleção da amostra, os seguintes critérios de exclusão foram utilizados: a adolescente apresentar complicações médicas ou obstétricas; a ocorrência de aborto num período de no mínimo seis meses anterior à pesquisa; feito uso de qualquer hematínico e contraceptivo oral no período de seis meses imediatamente anterior à concepção; fazer uso de drogas, fumo e álcool, e de dietas especiais. O levantamento de dados ocorreu no período de outubro de 1993 a dezembro de 1994 e as análises concluídas em 1996.

Considerando-se possíveis reações adversas aos medicamentos, eventuais esquecimentos no uso dos mesmos e falta à consulta, adotou-se como critério de permanência no estudo, o prazo máximo de 15 dias sem uso dos medicamentos.

Após aprovação do protocolo da pesquisa pelo Comitê de Ética da Instituição, e as adolescentes estarem cientes e concordantes com o estudo, as mesmas foram aleatoriamente distribuídas em cinco grupos, recebendo o seguinte esquema terapêutico: **Grupo I:** 120 mg de ferro e 250 µg de ácido fólico; **Grupo II:** 80 mg de ferro e 250 µg de ácido fólico; **Grupo III:** 120 mg de ferro, 250 µg de ácido fólico associado a 5 mg de zinco; **Grupo IV:** 80 mg de ferro e 250 µg de ácido fólico associado a 5 mg de zinco e **Grupo V:** 120 mg de ferro (rotina local). O composto ferro foi oferecido na forma de sulfato ferroso, contendo 20% de ferro elementar, administrado oralmente, em duas ou três vezes ao dia. Quanto ao ácido fólico, este foi fornecido na forma de monoglutamato, isolado ou associado ao sulfato de zinco ($ZnSO_4$) e tomados em dose única, associados ou não ao ferro, com um intervalo de no mínimo uma hora após às refeições.

Esse esquema terapêutico teve início na metade do segundo trimestre de gestação (16 a 20 semanas de gravidez), segundo o que preconiza o Ministério da Saúde, e término quando as adolescentes encontravam-se no período previsto para o parto, variando de 37 a 38 semanas de gestação.

Para efeito de controle e avaliação da intervenção, as adolescentes tinham mensalmente agendamento com o médico, e com a responsável pela pesquisa. Na consulta, era realizado o controle do uso dos medicamentos, pela contagem dos comprimidos restantes, e por meio de informação prestada pela paciente. Em seguida, era feita a entrega dos medicamentos do mês subsequente. Na oportunidade, realizava-se também tomadas de peso e altura, investigava-se eventuais problemas com a alimentação e rejeição aos medicamentos, bem como de qualquer tipo de intercorrência ligado à gravidez. Considerando: 1- possíveis reações adversas aos medicamentos; 2- possibilidade de eventuais esquecimentos no uso dos mesmos, e 3- falta na consulta, adotou-se como critério de permanência no estudo, o prazo total de 15 dias, de forma descontínua, sem uso dos medicamentos

Para a realização das avaliações hematológica e bioquímica do estado nutricional do ferro das adolescentes, foram realizadas duas coletas de sangue, com as pacientes em jejum de no mínimo 10 horas. Uma no período pré-intervenção, 16 a 20 semanas de gravidez, e a outra no pós-intervenção, 37 a 38 semanas. Para a dosagem da hemoglobina utilizou-se o método da cianometahemoglobina, adotando-se para a caracterização da anemia, o critério proposto pela OMS ($Hb < 11 \text{ g/dL}$) (18). Para o conhecimento das reservas de ferro foram determinadas as concentrações de ferritina plasmática, utilizando-se o método da quimioluminescência.

A análise estatística dos dados acerca da homogeneidade dos grupos para as variáveis investigadas foi realizada aplicando-se o teste de variância (ANOVA). Para efeito de comparação de valores indivíduo a indivíduo foi utilizado o teste "T-Student" pareado e o não paramétrico de Wilcoxon com significância definida com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do estudo sobre a condição nutricional das adolescentes referente ao ferro, no período pré-intervenção demonstram que, para a população geral, a média das concentrações de hemoglobina foi de $11,3 \pm 1,4 \text{ g/dL}$. Ou seja, as adolescentes encontravam-se em condições limítrofes quanto ao mineral, sendo este estado observado também nos diferentes grupos de intervenção. Apesar da média da concentração de hemoglobina da população ainda encontrar-se dentro dos valores da normalidade, 35% das adolescentes encontravam-se anêmicas. No que diz respeito aos estoques de ferro, os dados mostram uma concentração média de ferritina plasmática de $17,3 \pm 15,3 \text{ ng/mL}$.

Poucos são os dados disponíveis sobre anemia em adolescentes grávidas. A literatura internacional mostra que nos Estados Unidos, por exemplo, a prevalência desse quadro, no segundo trimestre de gravidez era de 15,9% (19), enquanto

que no Canadá, os estudos mostram 22% das adolescentes grávidas pesquisadas eram anêmicas (20).

Em nosso meio, esses valores alcançam cifras maiores, de 37,5 a 40% (21,22), aproximando-se, portanto, da prevalência encontrada nesse estudo (35%). Por outro lado, dados mais recentes apresentados por outros autores (23) mostram que a anemia estava presente em 14,2% da população de adolescente estudada, variando de zero, nas primeiras 12 semanas de gestação a 22,2% no período de 33 a 36 semanas de gravidez.

Quanto às reservas de ferro, adotando-se o ponto de corte de 12 ng/dL , o qual caracteriza o estado de depleção do mineral, os resultados mostraram que 52% das adolescentes encontravam-se que estoques de ferro - depletadas, valores próximos aos verificados pelo estudo acima referido (48,4%) (23) e menos crítico do que os observados por Godowsky (20).

Avaliando-se o efeito da suplementação com os nutrientes em estudo sobre os parâmetros em discussão, o que se observa na Tabela 1, é que a utilização de diferentes concentrações de ferro elementar (80 mg e 120 mg/dia), associado ou não ao ácido fólico e ácido fólico e zinco provocou melhora semelhante na resposta hemoglobínica, porém sem significado estatístico ($P < 0,05$) não refletido, por conseguinte (Gráfico 1) nas reservas orgânicas de ferro (ferritina plasmática).

Por outro lado, avaliando-se o impacto da suplementação sobre os índices de prevalência de anemia, na amostra total de adolescentes estudadas, verificou-se uma redução significativa nos valores pré-intervenção (35%) para 16%, uma diminuição, portanto de 54,3%.

TABELA 1

Médias e intervalos de confiança das concentrações de hemoglobina das adolescentes segundo os grupos, nos períodos pré e pós intervenção. Instituto de Perinatologia Social do Piauí- MDER

Grupos	Hemoglobina (g/dL) Pré- intervenção	Intervalo com 95% de confiança	Hemoglobina (g/dL) Pós- intervenção	Intervalo com 95% de confiança
Grupo I	11,24 \pm 1,1 (15)*	10,70-11,80	11,91 \pm 0,9 (15)	11,42-12,40
Grupo II	11,58 \pm 1,1 (13)	11,02-12,16	12,07 \pm 1,3 (13)	11,39-12,77
Grupo III	11,13 \pm 1,1 (16)	10,56-11,70	12,25 \pm 1,7 (16)	11,40-13,12
Grupo IV	11,10 \pm 2,2 (17)	10,05-12,17	11,51 \pm 2,2 (17)	10,47-12,55
Grupo V	11,56 \pm 1,1 (13)	10,97-12,15	12,14 \pm 1,6 (13)	11,27-13,03

(*) número de casos

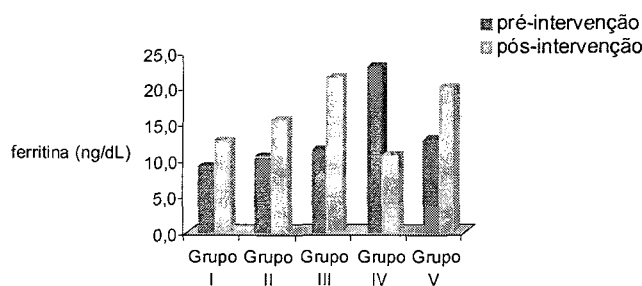
Analisando-se os dados deste estudo observa-se uma certa discordância com os encontrados por outros autores (24), que

verificaram, mediante suplementação com ferro (60 mg) e folato (0,25 mg), melhora significativa somente no que diz respeito às concentrações de hemoglobina e, só uma leve melhora no estado nutricional referente ao ferro. Contrariamente, estudos mais recentes conduzidos por O'BRIEN (25) demonstram uma boa resposta, tanto hemoglobínica quanto de reserva (ferritina) no uso destas mesmas concentrações de ferro e ácido fólico.

A efetividade de diferentes formas de intervenção no controle da deficiência de ferro vem sido avaliada. Estudo conduzido em São Paulo utilizando também as concentrações de 80 e 120mg de ferro, porém com frequência semanal e, 40 mg diárias mostrou que a utilização de 120mg de ferro uma vez por semana, pelo mínimo de 3 meses, constitui-se em uma estratégia de intervenção efetiva no controle da deficiência de ferro (26).

GRÁFICO 1

Mediana dos valores de ferritina plasmática nos períodos pré e pós intervenção.



CONCLUSÃO

A suplementação com 80 mg e 120 mg de ferro, na forma de sulfato ferroso, a partir da 16ª semana de gravidez até o parto, provocou melhora semelhante na resposta hemoglobínica porém, sem significado estatístico e sem refletir no ferro de reserva, estando este associado ou não ao ácido fólico e zinco. É importante destacar que a suplementação com ferro, durante a gravidez, é a estratégia de intervenção mais indicada no controle da anemia ferropriva. A questão que ainda persiste são as quantidades deste mineral que deverão ser utilizadas, e qual a frequência de uso das mesmas. Segundo o INSTITUTE of Medicine (27), suplementos contendo não mais do que 30 mg de ferro/dia deverão ser tomados, rotineiramente, por mulheres não anêmicas, para minimizar tanto os efeitos colaterais, quanto os efeitos potencialmente adversos do ferro sobre a absorção do zinco. Neste sentido, uma redução na frequência do uso do ferro suplementar por mulheres grávidas, uma ou duas vezes por semana, vem sendo amplamente examinada em

países em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

1. Position of the American Dietetic Association: Nutrition management of adolescent pregnancy. *J Am Diet Assoc* 1981;89:658-668.
2. Organização Mundial da Saúde. The prevalency of anemia in women: a tabulation of available information. Geneva: WHO, 1992.
3. Yip R. The challenge of controlling iron deficiency: sweet news from Guatemala. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1164-1165.
4. Williams MD, Wheby MS. Anemia in pregnancy. *Med Clin North* 1992;76:631-647.
5. Bailey LB, Cerda JJ. Iron and folate nutrition during life cycle. *Wld Rev Nutr Diet* 1988;56: 56-92.
6. Cornejo D, Sosa R & Vallejo J. Efecto de tres estrategias de suplementación com hierro y ácido fólico para el control y prevención de la anemia ferropriva en mujeres embarazadas. Tese apresentada à Universidade Central del Ecuador. Escuela de Graduados para obtenção do grau de Especialista en Ginecología y Obstetricia. 1997,126 p.
7. Milne DB, Canfield WK, Sandstead HH. Effect of oral folic acid supplements on zinc, copper, and iron absorption and excretion. *Am J Clin Nutr* 1984;39: 535-539.
8. Simmer K, James C, Thompson RP H. Are iron-folate supplements harmful? *Am J Clin Nutr* 1987;45:122-125.
9. Solomons NW. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: Consequences for human nutrition. *J Nutr*. 1986;116:927-935.
10. Pedrosa LFC, Cozzolino SMF. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade do zinco em dieta regional do Nordeste. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo- SP, 1989, 96 p.
11. Bloxam DL, Williams NR, Waskett RJD, Pattinson GPM, Morarji Y & Stewart SG. Maternal zinc during oral iron supplementation in pregnancy: a preliminary study. *Clin Sci*. 1989;76:59-65.
12. Dawson HW & Disney GW. Folate status of adolescent girl. *Fed. Proc.* 40, 1981.
13. Urgell MR, Banavides JF, González ALR, González EF. Maternal nutritional factors: significance for the fetus and the neonate. *Early Hum Dev* 1998;53:61-76.
14. Situação Mundial da Infância: A nutrição em foco. Fundo das Nações Unidas para a Infância- UNICEF, 1998.
15. BEMFAM/MACRO Internacional. Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde 1996. Final Report. Calverton, MD: BEMFAM/MACRO Internacional, 1997.
16. Gonçalves PE. Alimentação e nutrição na adolescência. *Rev. Paulista de Pediatria* 1988;6:82-89.
17. Morell MGG, Melo AV. A Declaração de Nascidos Vivos no Estado de São Paulo: alguns resultados. In: Nacer Aqui - Análise de uma nova fonte de dados sobre os nascimentos. Informe Demográfico nº 29. São Paulo: Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE), 1995:15-60.

18. International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG). Measure of iron status. Washigton: Nutrition Fondation. 1985. p. 78.
19. Beard JL. Iron deficiency: assessment during pregnancy and its importance in pregnant adolescents. *Am. J. Clin. Nutr* 1994;59:502S-510S.
20. Godowsky SL, Gale K, Wolfe AS, Jory J, Gibson R, O'Connor DL. Biochemical folate, B12, and iron status of a group of pregnant adolescents accessed through the public health system in Ontario, Canada. *J Adolesc Health* 1995;16:465-474.
21. Salzano AC, Batista Filho M, Flores H, Calado CLA. Prevalência de anemia no ciclo gestacional em dois Estados do Nordeste brasileiro, Pernambuco e Paraíba. *Ver. Bras. de Pesquisas Med. E biol* 1980;13:211-214.
22. Szaecarc SC. Prevalência de anemias nutricionais entre gestantes matriculadas em centros de saúde do Estado de São Paulo. São Paulo, 1983. (Tese de Livre Docência- Faculdade de Saúde Pública da USP).
23. Fujimori E, Oliveira IMV, Cassana N, Marina L, Szarfarc SC. Estado nutricional del hierro de gestantes adolescentes, São Paulo, Brasil. *Arch Latinoam Nutr* 1999;49:8-12.
24. Atukorala TMS, Silva LDR, Dechering W HJC, Dassenaeike TSC, Pereira RS. Evaluation of effectiveness of iron-folate supplementation and anthelmintic therapy against anemia in pregnancy a study in plantation sector of Sri Lanka. *Am J Clin Nutr* 1994;60:286-292.
25. O'Brien KO. et al. Influence of prenatal iron and zinc supplements on supplemental iron absorption, red blood cell iron incorporation, and iron status in pregnancy Peruvian women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:509-515.
26. Cassana N, Luz Marina. Intervenção nutricional no controle da deficiência de ferro em gestantes da rede básica de saúde. Tese apresentada à Faculdade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Nutrição, para obtenção do grau de doutor. 1998, 110 p.
27. Institute of medicine. Food and nutrition board. Committee on nutritional status during pregnancy and lactation. *Nutrition During Pregnancy. Parte II: Nutrient supplements.* Washington: National Academy Press, 1990. Apud: Wada, L., King, JC. Trace element nutrition during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1994;37: 574-586.

Recibido: 19-10-2000

Aceptado: 02-08-2001

Growth and hematological studies on Brazilian children of low socioeconomic level

Carlos A. Nogueira-de-Almeida, Rubens G. Ricco, Luiz A. Del Ciampo, Ana Maria de Souza, José Eduardo Dutra-de-Oliveira

University of Ribeirão Preto, SP, Brazil

SUMMARY. Anemia and undernutrition are common all over the world, especially in less developed countries. The relationship between low weight, short stature and iron deficiency should be better understood so that appropriate measures might be taken to prevent these problems. A total of 115 institutionalized children aged 12 to 72 months were studied in day-care institutions in the town of Pontal, Southeastern Brazil, during the second semester of 1999. Personal data, weight, height and hematological profile were obtained from all subjects. Food intake was evaluated in 20 children by a direct food-weighing method. The prevalence of low weight for age (2.6%), low weight for height (1.7%) and low height for age (4.3%) was considered low. Anemia was observed in 68.7% of the children. Diet was found to be adequate in terms of the major nutrients evaluated, but food iron supply was of low bioavailability. In conclusion, the population studied revealed a peculiar behavior i.e., the coexistence of fairly good anthropometric nutritional status along with iron-deficiency anemia. The prevention of this kind of malnutrition cannot be limited to an adequate calorie/protein supply but should also be based on the correction of the severe iron deficiency present in this low socioeconomic level preschool children in Brazil.

Key words: Anemia, malnutrition, children, alimentation, nutritional status, iron deficiency.

RESUMO. Crescimento e estado nutricional de ferro em crianças brasileiras de baixo nível sócio-econômico. Anemia e Subnutrição são problemas comuns em todo o mundo, especialmente nos países menos desenvolvidos. A relação entre baixo peso e baixa estatura e a deficiência de ferro precisam ser melhor compreendidas para que se possam instituir medidas de combate adequadas. Foram avaliadas 115 crianças institucionalizadas, com idades entre 12 e 72 meses, no segundo semestre de 1999, na cidade de Pontal, Sudeste do Brasil. Obtiveram-se Dados Pessoais, Peso, Estatura e dados Hematológicos. A partir de uma amostra de 20 crianças, foi realizada avaliação da alimentação através do método de Pesagem Direta dos Alimentos. As Prevalências de Baixo Peso para Idade (2,6%), Baixo Peso para Estatura (1,7%) e Baixa Estatura para Idade (4,3%) foram consideradas baixas. Observou-se Anemia em 68,7% das crianças. A alimentação revelou-se em geral adequada para os nutrientes avaliados mas observou-se que o ferro oferecido era de baixa biodisponibilidade. Em conclusão, a população estudada revelou um aspecto bastante peculiar isto é, a coexistência de bom estado nutricional antropométrico e anemia ferropriva. A prevenção desse tipo de subnutrição não pode se limitar ao adequado fornecimento de calorias e proteínas mas deve levar em conta, também, a presença marcante da deficiência de ferro nessa população carente do Brasil.

Palavras chave: Anemia, desnutrição, criança, alimentação, estado nutricional, deficiência de ferro.

INTRODUCTION

Undernutrition and anemia are detected in many developing countries, especially among children of lower socioeconomic condition. Inadequate food intake, parasitic infestations, poor hygiene, low educational level and low acquisitive power are some of the main causes of these high prevalences. The presence and relationship of these factors in different areas and countries is of great importance for a better understanding of the physiopathology, prevalence and prevention of these conditions

Undernutrition of different degrees is still a highly prevalent problem in many countries and regions, especially among children under five years of age. UNICEF (1) data

show that from 1990 to 1998, the prevalence of moderate and severe forms of low weight for age was 40% in underdeveloped countries, 31% in developing countries, 10% in Latin America and the Caribbean, and 30% in the World as a whole. In Brazil, data from Health Authorities (2) showed that in 1996, 5.7% of the children had severe weight deficiency for age. Regional differences are found in our country, with a prevalence of 8.3% in less developed regions and a prevalence of 2 to 4.7% in the more developed South and Southeast areas (2).

Iron deficiency is known to be the most frequent nutritional disorder world over, affecting large number of persons in all countries. More than two billion people are estimated to be affected, with anemia occurring in half of

them (3). In Brazil, the prevalence of anemia has been shown to be high and to be on the rise in some regions. In 1974, 22% of children aged 6 to 60 months living in the City of São Paulo were anemic (4). Monteiro and Szarfac (5) reported that, in 1984-1985, the prevalence of anemia in the State of São Paulo was 35.6% among children aged 6 to 60 months. Torres et al. (6) reported in 1993 a 59.1% prevalence of anemia among children aged 6 to 23 months attending 160 health units in 63 counties of the State of São Paulo.

Simultaneous presence of children undernutrition and anemia has been shown in Brazil and other parts of the world where malnutrition is severe (1, 7, 8). On the other hand, the presence of anemia with normal growth is not so common and requires further investigation in terms of physiopathology and prevention. In Brazil, Dutra-de-Oliveira reported the presence of this situation in a small sample of children attending day-care centers in the State of São Paulo, Southern part of the country (9).

Considering all these factors, the present investigation was carried out on a group of children of low socioeconomic level attending day-care centers in a small town in Southeast Brazil in order to characterize the nutritional status of these children, mainly through anthropometric data, and to relate it to their hematological status. Information on the food offered to the children was also obtained in to discuss its possible relationship to the iron status. The importance of these findings for current complementary nutrition programs for Brazilian children is emphasized.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out at 2 public day-care centers in a small town called Pontal, State of S. Paulo, with a large underprivileged population, including rural workers. According to the 1996 census of the Brazilian Institute of Geography and Statistics, the town has about 26,916 inhabitants, 4,378 of whom are rural workers. A total of 27,177 of the 31,947 hectares of the county area are used for agricultural activities, mainly sugar-cane production (10). The day-care centers studied are the only public ones operating in the town, providing care for most of the children from poorer families, whose parents work outside their homes.

At first 228 children, aged 12 to 72 months, were included in the study and their parents authorized them to participate. Of these, 115 completed the study while the remaining ones were excluded because of febrile diseases, impossibility to perform anthropometry or incomplete laboratory tests. Data were collected from July 1 to December 31, 1999. The study was approved by the local Health Ethics Committee.

Three types of data were collected: clinical nutritional/anthropometric values, hematological laboratory evaluation and food intake. The nutritional study included clinical and

anthropometric data such as age, sex, weight, and height. The ASP software (11) was used to calculate the z scores for weight for age (W/I), weight for height (W/H) and height for age (H/A). Children with a z score higher than -2 were considered to be eutrophic, and children with a z score lower than -2 were considered to be anthropometrically deficient. The mean (M), standard deviation (SD) and the median (MD) were also calculated for the three indices used. The anthropometric measurements were made by a nurse trained for this task, using research type scales and anthropometers, controlled and calibrated against standard parameters.

The material for the hematology studies was collected in the morning when the children arrived at the day-care center, under fasting conditions. Seven ml of blood was obtained from the cubital vein and divided into two tubes, with and without anticoagulant. The samples were sent to two laboratories of recognized competence, linked to the University, where the following determinations were carried out:

- Hemoglobin, hematocrit and mean corpuscular volume (MCV) using a T-890^R Coulter counter.
- Serum iron and total iron binding capacity (TIBC) using the ferrozine method and the Cobas Mira Plus kit (Roche^R), with calculation of the transferrin saturation index (TSI) as the ratio of serum iron to TIBC.
- Ferritin, by the Enzyme Linked Fluorescent Assay, using the Mimividas kit (Bio-Mérieux^R).
- Transferrin receptor: determined by immunoenzymatic assay using the Spectro-Ferritin kit of Ramco Laboratories^R.
- Test of red blood cell sickling.

The following cut-off points were used to determine anemia and iron-deficiency (12-15): hemoglobin (lower than 11 mg/dl for children younger than 4 years and lower than 11.5 mg/dl for children older than 4 years), MCV (lower than 72 fl for children younger than 4 years and lower than 75 fl for children older than 4 years), TSI (lower than 12%), ferritin (lower than 12 ng/ml), transferrin receptor (higher than 28 nmol/l).

For the diet study, a random sample of their daily food intake was obtained from 20 children, including all meals and using the method of direct individual food weighing (16). The data for individual consumption of each meal was obtained on two different days during the week. The meals were monitored from breakfast to supper, for a total of four meals a day. The ingested foods were weighed on an electronic scale with 0.01 g sensitivity; leftover food and repeated intake were also determined, when present. When parents of the 20 children who had their food intake measured came to the institution to pick up their children, they were

instructed to record any food offered to the children that night and the record was delivered to us on the following day. The total food intake were recorded and analyzed with a computer software (17).

Intake of calories, macro and micro nutrients was calculated and compared to the recommended dietary allowances (18). To guarantee that the results obtained from the food intake survey could be extrapolated to the study population, the 20 children were divided into two groups of 10, which were compared with the parcel of the population of the same age range in terms of 3 variables: z score for weight for age, hemoglobin value and MCV value. Data were analyzed by the Student *t*-test, with the level of significance set at 5% using the estimate of the confidence intervals. The groups were considered to be similar when the population mean was within the confidence interval estimated on the basis of the sample mean for the three variables evaluated (19).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 summarizes the results obtained for the anthropometric and laboratory studies. It can be seen that the children were distributed over all the age ranges proposed, with a slight predominance of older children. Sex distribution was practically identical. With respect to anthropometry, 8.7% presented deficiency of at least one of the indices studied, the most frequent deficit being height/age (4.3%). The mean and median z scores for weight/age (-0.2 and -0.1) and for weight/height (0 and 0) were always close or equal to 0. The z score for height/age tended to show lower values (-0.2 and -0.3), with a mean and median lower than zero associated with a higher standard deviation (SD -1.2).

When these anthropometric values were compared with data for the United States and the Brazilian population (20), the mean z score for weight/height (-0.2) was above the Brazilian mean (-0.71) and comparable to the mean for white American children (0.11). The mean z score for the height/age index (-0.2) was higher than the Brazilian mean (-1.32) and similar to the American mean (-0.23). These facts, show the anthropometric index for the population studied to be quite satisfactory, a characteristic of the more developed areas of Brazil, especially the Southeast. Anthropometric evaluation of nutritional status yields results similar to those obtained in developed countries, with a low prevalence of anthropometric deficits. Comparing data for the reference population of Brazil, the Southeast Region (21), with NCHS (22), a high agreement is found between the two populations in terms of weight and height with Brazilian medians actually almost always higher than American ones (23).

TABLE 1
Data from the 115 children of the two institutions studied

Variable	Description	Total	%
AGE	12 to 24 months	13	11.3
	25 to 36 months	18	15.7
	37 to 48 months	29	25.2
	49 to 60 months	28	24.3
	61 to 72 months	27	23.5
SEX	Male	58	50.4
	Female	57	49.6
ANEMIA	Hb < 11 (12 - 48 months)	79	68.7
	Hb < 11.5 (> 48 months)		
Iron deficiency anemia	Low Hb and Low MCV and/or Low TSI and/or Low Ferritin and/or High Transferrin receptor	59	51.3
Iron nutritional status	MCV < 72 fl (12 - 47 months)	24	20.9
	< 75 fl (> 48 months)		
	TSI < 12%	48	41.7
	Ferritin < 12 ng/ml	27	23.5
	Transferrin receptor >28 nmol/ml	71	61.7
Nutritional status determined by anthropometry (Z Score of less than -2)	Deficient W/A, W/H or H/A	10	8.7
	Deficient W/A	3	2.6
	Deficient W/H	2	1.7
	Deficient H/A	5	4.3

The hematologic data showed 68.7% of the children to be anemic (low Hb level), with at least one abnormal iron test (MCV, Transferrin Saturation, Ferritin and Transferrin Receptor). These results indicate the presence of Iron-Deficiency Anemia, which was observed in 51.3% of them. In contrast to the model often used to explain iron-deficiency anemia, which points out successive and consecutive depletion of iron stores (evaluated on the basis of ferritin), followed by low iron available for erythropoiesis (evaluated on the basis of MCV, transferrin receptor and TSI) and later on by hemoglobin, the present study showed that among the 68.7% anemic children only 20.9%, 23.5% and 41.7% presented low MCV, ferritin and TSI, respectively. The transferrin receptor proved to be a sensitive method for the detection of iron-deficient children, with an observed 61.7% prevalence of values above the cut-off point, confirming previous experience of our group with this parameter (24). The red blood cell sickling test was negative in 100% of the children.

Table 2 summarizes the analysis of food intake by the 20 children studied. It can be seen that mean calorie intake was about $\frac{3}{4}$ of recommended levels. In addition, the diet was found to contain high protein levels, but low intake of proteins of high biological value. Iron and vitamin A intake was adequate and vitamin C intake was 70.8% of the recommended levels. Fibers were well below recommended levels. No tannins were considered to be present in the diet over the two days studied.

TABLE 2
Dietary nutrient intake of the 20 children and their adequacy in relation to the RDA

Nutrient	Pontal	RDA	% Adequacy
Energy (Kcal)	995.7	1300	76.6%
Proteins (g)	39.8	20	199%
Protein of high biological value (%)	36.5	50	70%
Iron (mg)	9.8	10	98%
Vitamin C (mg)	30.1	42.5	70.8%
Vitamin A (IU)	1168	911	128%
Fibers (g)	1.3	9.9	13%

It is of interest to point out that the sample used for the study of food intake was found to be similar to that of the population from which it was derived in terms of the three variables studied, with the mean z scores for weight/age, hemoglobin and MCV for the 115 children studied being

within the 95% confidence interval for the sample mean. Thus, it was concluded that the evaluation performed on the sample of 20 children could be considered representative of the food intake of the study group as a whole (Table 3).

The evaluation of diet considering RDA and correcting for the Brazilian mean weight in relation to calorie intake, the nutrient intake of the study population is around 75% of its requirements, an amount that could represent a sufficient energy supply to promote adequate growth for most of the children. Protein intake was practically double that proposed by the RDA, rich in plant protein sources, especially rice and beans, and combined with small amounts of meat and milk (25). The iron supply covering 98% of the requirements, associated with a reasonable supply of factors which facilitate its absorption, such as vitamin C and a low fiber and tannin sources, could also be considered adequate. In addition, if we consider that the presence of low iron reserves increases iron absorption from 15 to 35% (26), ferritin analysis showed that only 23% of the children (ferritin < 12ng/ml) benefited from this fact. The low intake of meat in the diet may have contributed to the higher prevalence of iron-deficiency anemia in these children in two ways: low iron supply and reduced presence of foods of animal origin. Indeed, results obtained in dietary surveys, even when the latter are carried out according to a rigorous methodology as in our case, cannot always be used as single parameter for the evaluation of nutrition in pediatric populations. On the other hand, they may offer important information on the risk of specific nutritional deficiencies, such as anemia (27).

TABLE 3
Z score for weight for age, hemoglobin values and MCV values obtained for 2 dietary intake samples of the population of the 2 institutions studied

Groups	Mean Z score for weight for age			Mean hemoglobin levels			MCV		
	Sample Mean \pm SD	Confidence interval	Population: Mean \pm SD	Sample Mean \pm SD	Confidence interval	Population: Mean \pm SD	Sample Mean \pm SD	Confidence Interval	Population: Mean \pm SD
12 to 36 months	0.12 \pm 0.7	-0.42 to 0.67	-0.17 \pm 1.05	10.1 \pm 1.7	8.78 to 11.31	10.2 \pm 1.4	70.9 \pm 9.8	63.9 to 77.9	71.3 \pm 7.3
37 to 72 months	-0.26 \pm 1.3	-1.21 to 0.69	-0.22 \pm 1.46	10.7 \pm 1.6	9.55 to 11.80	11.0 \pm 1.0	75.8 \pm 8.2	69.9 to 81.7	78.8 \pm 5.4

Despite efforts of international organizations and the proposals for drastic reduction of iron deficiency anemia in the world by the year 2000 (7), small advances have been made in the development and implementation of strategies that will reach this aim. Indeed, the fight against iron-deficiency anemia should be linked to overall nutritional interventions as well as specific actions, that certainly are

not limited to therapeutical treatment of clinical disease (28).

The present study including clinical, hematological and food intake data shows that the available large food distribution program to preschool and school feeding programs in the State of São Paulo is apparently able to guarantee desirable growth of our low socioeconomic children but the prevalence of iron deficiency is high and

sometimes increasing (4, 5, 6). Our findings show this peculiar situation of the children studied: the group of children has an adequate physical development with a high prevalence of anemia, in spite of a reasonable good diet.

The explanation for the presence of iron deficiency and iron deficiency anemia in regions with a high prevalence of severe undernutrition is certainly linked to an all over deficient diet, including energy, iron and other macro and micro nutrients. This situation is found in the Northeast part of Brazil, the poorest part of our country, where it has been reported a high prevalence of 48.3% energy protein malnutrition along with the presence of 54% of iron deficiency anemia. A similar situation is also found in Southern Asia (51% of iron deficiency anemia and 51% of weight for age deficiency) and in other parts of the world, such as Southeast Asia or Pakistan (1, 7, 8).

The situation found in our children of the Southern part of Brazil, where the socioeconomic situation is the best of our country, is different on the way that the amount of protein energy undernutrition is quite low and anemia is quite high.

These findings are important for the implementation and follow up of nutritional programs to fight children malnutrition. They should be understood not only as cases of growth failure and/or deficits, criteria normally used for the users screening of these feeding programs in Brazil. Other nutrients, and in our cases, the supply of iron is a *si ne qua non* element. Walker (29), in a recent review on this topic stated that supplementation with medications or food fortification are always needed to control iron deficiency, especially in poor countries. An interesting study conducted in England also shows that not even the most rigorous dietary education can prevent iron deficiency in children, it needs extra supplies of iron for this (30). Considering the severe damage to the physical and mental development of children that caused by iron deficiency and iron anemia, children nutrition policies and feeding programs should definitely be revised to include not only energy and protein as has been used in several countries. Iron is sometimes so or more important than protein/energy. This component will allow the children to grow and gain weight, but iron is a key factor for them to develop at their full potential.

REFERENCES

- UNICEF. The state of World Child Health 1998. Available from: URL: <http://www.unicef>
- DATASUS. Indicadores básicos de morbidade e fator de risco do Brasil 1998. Available from: URL: <http://www.datasus.gov.br/cgi/ldb98/morb.htm>
- Layrisse M, Cháves JF, Mendez-Castellano H, Bosch V, Tropper E, Bastardo B, Gozález E. Early response to the effect of iron fortification in the Venezuelan population. *Am J Clin Nutr* 1996;64:903-7.
- Sigulem DM et al. Anemia ferropriva em crianças no município de São Paulo. *Rev Saúde Pública* 1978;12:168-78.
- Monteiro CA, Szarfac SC. Estudo das condições de saúde das crianças no município de São Paulo, Brasil(1984-1985). *Rev Saúde Pública* 1987;21:255-66.
- Torres MAA, Sato K, Queiroz SS. Anemia em crianças menores de dois anos atendidas nas unidades básicas de saúde no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1994;28:290-4.
- Lönnerdal B, Dewey KG. Epidemiologia da deficiência de ferro no lactente e na criança. *Anais Nestlé* 1996;52:11-7.
- Molla A, Khurshid M, Molla AM, Badruddin SH, Hendricks K, Snyder JD. Is anemia an accurate predictor of vitamin A status in Pakistani children? *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:276-9.
- Dutra-de-Oliveira JE, Ferreira JB, Vasconcellos VP, Marchini JS. Drinking water as an iron carrier to control anemia in preschool children in a Day-care Center. *J Am Coll Nut* 1994;13:198-202.
- IBGE. Contagem da População Brasileira(1996). Available from: URL: <http://www.ibge.gov.br/estatistica/populacao/contagem/default.shtm>
- Jordan M. Anthropometric Stistical Package (ASP). Div. Of Nutrition, CHPE, Center for Disease Control (CDC), 1988.
- Dallman PR, Siimes MA, Stekel A. Iron deficiency in infancy and childhood. *Am J Clin Nutr* 1980;33:86-118.
- Cook JD, Finch CA. Assessing iron status of a population. *Am J Clin Nutr* 1979;32: 2115-9.
- Expert Scientific Working Group. Summary of a report on assessment of the iron nutritional status of the United States population. *Am J Clin Nutr* 1985;42:1318-30.
- Yip R, Johnson C, Dallman PR. Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. *Am J Clin Nutr* 1984;39:427-36.
- DeHoog S. Avaliação do estado nutricional. In: Mahan LK, Escott-Stump, editors. *Krause, Alimentos Nutrição e Dietoterapia*. 9ª ed, São Paulo (Brasil):Roca,1998:371-95.
- Anção MS, Cuppari L, Tudisio ES, Draibe SA, Sigulén D. Sistema de Apoio a decisão em Nutrição (software). Versão 2.5, UNIFESP, São Paulo (Brasil), 1997.
- Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências Nutricionais*. 1ª ed, São Paulo (Brasil):Sarvier,1998.
- Beigelman B. Curso Prático de Bioestatística. 1ª ed, Ribeirão Preto (Brazil), Revista Brasileira de Genética; 1996.
- WHO Working Group On Infant Growth. An evaluation of infant growth: the use and interpretation of anthropometry in infants. *Bull WHO* 1995;73:165-74.
- Marcondes E, Berquó ES, Yunes J et al. Estudo antropométrico de crianças brasileiras de zero a doze anos de idade. *Anais Nestlé*, 1971.
- NCHS. Myattsville, MD, 1977. Growth curves for children birth - 18 years - USA - DHEW Publication, nº. (PHS) 78-1650 - National Center for Health Statistics, Hyattsville, Md., 1977.
- Nogueira-de-Almeida CA, Ricco RG, Del Ciampo LA, Nogueira MPC, Muccillo G. Comparison of four anthropometric methods of nutritional assessment and evaluation of the agreement between two reference populations. *J Trop Pediatr* 1999; 45: 345-50.

24. Souza AM, Dutra-de-Oliveira JE. Serum Transferrin Receptor response to iron salts in children: a year follow up. *Bol Chim Farmaceutico* 1999; 138(2): 199.
25. Dutra-de-Oliveira JE, Cunha SFC, Marchini JS. *A desnutrição dos pobres e dos ricos*. 1st ed, São Paulo (Brasil):Sarvier;1996.
26. Latunde-Dada GO, Dutra-de-Oliveira JE, Carillo SV, Marchini JS, Bianchi MLP. Gastrointestinal tract and iron absorption: a review. *Alim Nutr (São Paulo)* 1998;9:103-25.
27. Boutry M, Needlman R. Use of diet history in the screening of iron deficiency. *Pediatrics* 1996;98:1138-42.
28. Fisberg M. Anemia carencial: prevenção ou tratamento? *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)* 1995;71(2):59-60.
29. Walker ARP. The remedying of iron deficiency: what priority should it have? *Br J Nutr* 1998;79: 227-35.
30. Childs F, Aukett A, Darbyshire P, Ilett S, Livera LN. Dietary education and iron deficiency anaemia in the inner city. *Arch Dis Child* 1997;76:144-7.

Recibido: 27-04-2000

Aceptado: 02-08-2001

Serum lipids and lipoprotein levels in Costa Rican 13-18 year-old teenagers

Rafael Monge-Rojas

Costa Rican Institute for Research and Education on Nutrition and Health (Inciensa). Costa Rica

SUMMARY. Adverse levels of serum lipids tend to persist over time into adolescence and young adulthood, underlying the progression of Coronary Artery Disease (CAD). Therefore, the lipid profile of Costa Rican adolescents and its relationship with dietary intake, physical activity and Body Mass Index (BMI) was evaluated in a total of 322 adolescents ages 13-18 years from urban and rural areas of San José, Costa Rica. Levels of Total Cholesterol (TC) and HDL-C (High-Density Lipoprotein Cholesterol) were significantly higher in urban adolescents than in rural youngsters. No differences were found between LDL-C (Low-Density Lipoprotein Cholesterol) and triglyceride levels among urban and rural adolescents. TC, HDL-C and LDL-C levels were higher in females than in males. The mean LDL/HDL ratio was 2.3 with no differences between gender and area. Over 20% of adolescents showed borderline TC levels (4.42-5.17 mmol/L) and 10% borderline LDL-C levels (2.86-3.35 mmol/L). The proportion of females with borderline TC and LDL-C was higher than the proportion of males. No differences were found between areas. Around 50% of adolescents showed borderline HDL-C levels (0.91-1.17 mmol/L) and over 55% presented borderline triglyceride level (1.02-1.46 mmol/L). The prevalence of borderline and high triglyceride levels (≥ 1.47 mmol/L) between urban and rural adolescents was similar. However the prevalence of high triglyceride levels was higher in females (22%) than in males (14%). An independent positive relationship was found between LDL-C, triglyceride, the cardiovascular fitness score and BMI. Likewise a negative relationship was found between cardiovascular fitness, BMI, gender and HDL-C. This study suggests that primary prevention programs are required to decrease the prevalence of cardiovascular risk factors among Costa Rican adolescents.

Key words: Coronary artery disease, adolescents, lipids, lipoproteins, physical activity, dietary intake, Costa Rica.

RESUMEN. Niveles séricos de lípidos y lipoproteínas en adolescentes costarricenses de 13 -18 años. Los niveles adversos de lípidos séricos tienden a persistir a lo largo del tiempo desde la adolescencia y la juventud favoreciendo el progreso de la Enfermedad de las Arterias Coronarias (EAC). Por tal razón se evaluó el perfil lipídico y su relación con el consumo dietético, actividad física e Índice de Masa Corporal (IMC) en 322 adolescentes de 13-18 años residentes de áreas urbanas y rurales de San José, Costa Rica. Los niveles de colesterol total (CT) y HDL-C (lipoproteínas de alta densidad) fueron mayores en los adolescentes urbanos que en los rurales. No obstante, no se observaron diferencias en los niveles de LDL-C (lipoproteínas de baja densidad) y triglicéridos (TG). Los niveles promedio de CT, HDL-C y LDL-C fueron mayores en mujeres que en hombres. El valor promedio del radio LDL/HDL fue 2.3, sin evidenciarse diferencias por sexo y área. Cerca del 50% de los adolescentes mostraron un nivel limítrofe de C-HDL (0.91-1.17 mmol/L) y más del 55% presentaron niveles limítrofes de TG (1.02-1.46 mmol/L). La prevalencia de niveles limítrofes y elevados de TG entre los adolescentes urbanos y rurales fue similar. Sin embargo, la prevalencia de niveles elevados de TG fue mayor en mujeres (22%) que en hombres (14%). El análisis de regresión lineal determinó una relación positiva e independiente entre los niveles de C-LDL, TG, puntaje de resistencia cardiovascular e IMC. Así mismo se encontró una relación negativa entre el puntaje de resistencia cardiovascular, IMC, sexo y niveles de C-HDL. En conclusión, este estudio sugiere la necesidad de implementar programas de prevención primaria para disminuir la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular entre los adolescentes costarricenses.

Palabras clave: Enfermedad de las arterias coronarias, adolescentes, lípidos, lipoproteínas, actividad física, consumo dietético, Costa Rica.

INTRODUCTION

Serum lipoproteins are an important risk factor for Coronary Artery Disease (CAD). Overweight; low cardiovascular fitness, high saturated fat intake, cigarette smoking and family genetics cause unfavorable alterations in serum lipids (1).

Elevated levels of serum low-density lipoprotein (LDL-C) and decreased levels of high-density lipoprotein (HDL-

C) are associated with atherosclerosis lesion development in many epidemiological studies (1, 2). In addition, autopsy studies have demonstrated a strong association between adverse lipoprotein levels and the initial stages of atherosclerosis in adolescents and young adults (1, 3). Elevated serum triglyceride levels play a central role in the occurrence of several CAD risk factors (4), especially those related to insulin resistance syndrome (5).

Adverse levels of serum lipids tend to persist over time into adolescence and young adulthood (6, 7), underlying the progression of CAD. Tracking data has been used to predict adult levels of Total Cholesterol, HDL-C and LDL-C from childhood and adolescence levels (8 -10). About 25-70% of adult cholesterol variability has been explained by cholesterol levels in childhood and adolescence (2, 10).

Available evidence suggests that behavior traits associated with increased CAD risk are acquired early in life and may accelerate the development of CAD (1-3). Therefore, identifying serum lipid levels in adolescents is important for the primary prevention of this disease. The results of several studies have clearly documented that avoidance of the adverse lipid profile in early youth is essential for stemming the CAD progression in later years (2,3,6,8,9,10) This reference appears particularly important in Costa Rica where CAD represents the main cause of death (11).

The aim of this study was to determine the serum cholesterol, lipoprotein and triglyceride levels in urban and rural Costa Rican adolescents and the correlation between the body mass index (BMI), cardiovascular fitness and dietary intake.

METHODS

Sample

Of the 350 eligible 13-18 year-old adolescents, 92% consented to participate in the survey. The total sample of 322, 52% males and 48% females, was selected from 10 public high schools in San José. High schools were classified either as urban or rural according to the socio-demographic characteristics of the zone. This classification was designed based on the socio-demographic characterization of the geographic population areas of Costa Rica as defined by the National Department of Statistics (12).

Thirty students, 50% male, were randomly selected from each education center (around 7 student per level). Both parents and adolescents gave their written consent to participate in the study. All adolescents included in the study were screened for diseases that may affect blood lipoprotein levels.

Biochemical measurements

After 12 hours of fasting, a blood sample was taken from an antecubital vein using Vacutainer tubes containing a clot activator (Becton, Dickinson & Co). Serum was separated by centrifugation at 2000 G for 20 min at 5° C. HDL-C was separated using a phosphotungstic acid/Mg²⁺ reagent (Randox, England) and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The colorimetric reaction was determined in a Gilford spectrophotometer Stasar III at 505 nm and 37°C. Total plasma cholesterol (TC), triglyceride (TG) and glucose (GL)

were determined by enzymatic methods (Wiener Lab, Rosario-Argentina) using an automatic analyzer ASCA (LSI Instruments) at 505 nm and 37°C. LDL-C was calculated with the Friedwald *et al.* equation (13). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation for total serum cholesterol were 2.5 and 2.9 percent and for HDL cholesterol, 6 and 7 percent respectively. The coefficient of variation for triglycerides was less than 4 percent for these analyses. Serum glucose (GL) was measured by the glucose oxidase method (Beckman Glucose Analyzer II, Beckman Instruments Corp., Fullerton CA) (14). TC and LDL-C concentrations were classified according to the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents guidelines (1) (rounded to the nearest tenth): Acceptable TC < 4.42 mmol/L, borderline TC = 4.4 to 5.17 mmol/L; high TC 5.2 mmol/L; acceptable LDL < 1.04 mmol/L, borderline LDL-C = 2.86 to 3.35 mmol/L; high LDL-C 3.38 mmol/L. HDL-C and TG concentration were classified according to the Johns Hopkins guidelines (15) (rounded to the nearest tenth): acceptable TG < 0.85 mmol/L, borderline TG = 0.85 to 1.12 mmol/L; high TG 1.13 mmol/L; acceptable HDL > 1.17 mmol/L, borderline HDL-C = 1.04 to 1.17 mmol/L; low HDL-C = 1.04 mmol/L.

Dietary intake

Dietary intake was determined by three-day food records (16). A series of six photographs of food commonly consumed in Costa Rica was used to estimate portion size while keeping the food record. Foods and three-dimensional food models were used during the food record verification. Intake was analyzed by the Food Processor software for Windows, version 6.0 (Esha Research).

Physical activity

Cardiovascular fitness was measured using a Harvard step test modified by Bush *et al.* (17). Each adolescent stepped up and down on a 33 cm. high bench 30 times per minute for 4 minutes. At the end of the test, pulse was measured at 30 second intervals for three minutes and summed at one, two and three minutes to derive the sum of pulses. The sum of pulses determined the score assigned to each adolescent. : ≥ 397 = 5; 342 - 396 = 4; 300 - 341 = 3; 266 - 299 = 2; and ≤ 299 = 1. Scores were interpreted as follows: 1 = excellent cardiovascular fitness, 2 = above average, 3 = average, 4 = below average, 5 = needs improvement. Adolescents who scored above 3 were considered sedentary.

Anthropometry

Weight was measured without shoes and with heavy outer clothing removed. Height was measured with the student shoeless and facing away from the scale. Standing height was measured to the nearest 0.1 cm and weight was measured to 0.1 kg. Independent duplicate measurements were obtained

for height and weight, and the average of two readings, required to be within ± 0.50 cm or 0.5 kg respectively, was used in data analyses.

Adolescents with a Body Mass Index (BMI) \geq 85th percentile but $<$ 95th percentile were considered at risk for overweight as suggested by the World Health Organization Expert Committee (18). In the absence of other data specifying optimum cut-off values for BMI in adolescence; the BMI for age data for US children was used, as recommended by the WHO Expert Committee (18).

Biochemical, dietary, physical activity and anthropometry data were collected during three consecutive months under similar environmental conditions.

Statistical analysis

Data were examined with SPSS for Windows using analysis of variance as appropriate for continuous variables and a Chi-square test for categorical data. Multiple regression analysis was used to develop models with the different lipids as dependent variables. After examining univariate relationships between variables, multivariate stepwise models were initially used to identify which correlated variables provided the best model with a particular dependent variable. Collinearity was minimized by this approach, and correlation coefficients between independent variables included in the regression models did not exceed 0.3. A level of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Table 1 shows the characteristics of the study population. The sample consisted of 170 urban and 152 rural adolescents; 52% from urban areas and 48% from rural areas. All adolescents were from the same ethnic background (mestizo). Mean age was 15 ± 1.6 year-old.

Mean energy intake was 2151 ± 679 calories, with urban adolescents consuming more calories than rural youngsters ($p=0.0048$) (Table 1). Energy intake from saturated fats was 2% lower in rural than in urban adolescents ($p=0.000$), for whom it was 12%. More than 35% of the adolescents studied had a saturated fat intake greater than 10% Total Energy (TE). Indeed, saturated fat intake was significantly high ($> 10\%$ Total Energy) among urban adolescents and females ($p < 0.001$) (data not shown).

Reported mean daily energy from total carbohydrate was 4% higher in rural adolescents ($p=0.003$), for whom the reported approaches 55%. Mean intake of energy from sucrose was 19%, with no differences between urban and rural youngsters. Around 95% of urban and rural adolescents reported a sucrose intake higher than 10% of total energy. Mean intake of energy from polyunsaturated fat was similar

among urban and rural adolescents (6%). Only 30% of adolescents reported appropriate intake of polyunsaturated fatty acids (7-8% of the total energy intake).

TABLE 1
Characteristics of the study population

Variable	Urban adolescents ^a	Rural adolescents ^a	p value*
n	170	152	—
Age (years)	15.4 ± 1.6	15.2 ± 1.7	NS
Energy intake (Kcal)	2268 ± 681	2035 ± 731	0.0048
% Energy from saturated fat	12 ± 3	10 ± 3	0.0000
% Energy from polyunsaturated fat	6 ± 3	6 ± 3	NS
% Energy from total carbohydrate	56 ± 7	59 ± 8	0.0008
% Energy from sucrose	20 ± 7	18 ± 5	NS
BMI (Kg/m ²)	21.1 ± 3	21.2 ± 3	NS
Cardiovascular fitness score	3.6 ± 1.1	3.2 ± 1.2	0.0040

^a Means \pm standard deviation, * Tested with analysis of variance, $p > 0.05$ = not significant "NS".

Mean BMI was similar among urban and rural adolescents. The prevalence of overweight was higher in urban (13%) than rural adolescents (9%), but these differences were not significant.

The mean fitness scores for urban and rural youngsters were 3.6 and 3.2%, respectively ($p=0.004$). The low score found in rural adolescents suggests that they have a higher level of cardiovascular fitness than urban; however, the mean fitness score for both groups was below average (score equal 3). 63% of urban and 44% of rural adolescents ($p=0.000$) were considered sedentary.

The prevalence of sedentariness (cardiovascular fitness score below 3) among females (76.5%) was significantly higher ($p=0.001$) than among males (31.5%). Likewise, sedentariness among urban males (43%) was significantly greater ($p=0.012$) than among rural males (20%). There were no significant differences in females (data not shown).

Serum lipids and glucose levels

The mean values for serum cholesterol, lipoproteins, triglyceride and glucose levels from the adolescent population studied are presented in Table 2. Total cholesterol (TC) was significantly higher ($p=0.000$) in females than males (4.23 mmol/L and 3.82 mmol/L respectively). Likewise, HDL-C and LDL-C levels were significantly higher in females than in males (1.14 mmol/L and 0.07 mmol/L respectively, $p=0.000$).

TABLE 2
Serum lipids and glucose levels in urban and rural Costa Rican adolescents (n=322)

Parameter	Gender		p*	Males		p*	Females		p*	Total		p*
	Males (n=166)	Females (n=156)		Urban (n=87)	Rural (n=79)		Urban (n=83)	Rural (n=73)		Urban (n=170)	Rural (n=152)	
Total cholesterol (mmol/L)	3.82± 0.6	4.24± 0.6	0.0000	3.93± 0.5	3.72± 0.6	0.0188	4.26± 0.6	4.18± 0.6	NS	4.08± 0.6	3.95± 0.6	0.0420
HDL cholesterol (mmol/L)	0.07± 0.2	1.14± 0.2	0.0011	1.14± 0.2	1.01± 0.2	0.0000	1.14± 0.2	1.07± 0.1	0.0000	1.17± 0.2	1.04± 0.2	0.0000
LDL cholesterol (mmol/L)	2.18± 0.5	2.47± 0.6	0.0000	2.21± 0.5	2.13± 0.5	NS	2.44± 0.8	2.49± 0.6	NS	2.31± 0.5	2.31± 0.5	NS
LDL-C/HDL-C ratio	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.2	NS	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.3	NS	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	NS	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.4	NS
Triglyceride (mmol/L)	1.16± 0.3	1.31± 0.3	NS	1.17± 0.3	1.19± 0.3	NS	1.24± 0.3	1.34± 0.3	NS	1.22± 0.3	1.26± 0.4	NS
Glucose (mg/dl)	74±9	73 ±8	NS	74±7	74±11	NS	72 ±7	75±8	NS	73±7	74±10	NS

TC: Total Cholesterol, HDL-C: HDL Cholesterol. To convert mmol/L cholesterol to mg/dl multiply mmol/L by 38.7. To convert mmol/L triglyceride to mg/dl, multiply mmol/L by 88.6. * Tested with analysis of variance, p> 0.05= not significant " NS".

The mean value for TC was 3.93 mmol/L in urban males. This value was 0.21 mmol/L higher (p= 0.0188) than the mean value for TC evidenced in rural males (3.72 mmol/L). No differences were found between TC levels in females. The mean value for HDL-C was 0.62 mmol/L. The mean value for HDL-C was significantly higher in urban adolescents than in rural youngsters (1.17 mmol/L and 1.04 mmol/L respectively, p= 0.0000). LDL/HDL ratio averaged 2.3 with no differences between gender and area.

Serum triglyceride levels averaged 1.19 mmol/L for males with no differences between urban and rural youngsters. Females behaved similarly, but their mean value was slightly higher (1.31 mmol/L; NS).

Glucose levels averaged 73 mg/dl with no differences between urban and rural youngsters.

Table 3 provides the classification of serum lipids for urban and rural adolescents based on the National Cholesterol Education Program and Johns Hopkins guidelines. The proportion (25%) of females with borderline TC levels (4.42-5.17 mmol/L) was significantly higher (p=0.002) than the proportion of males (13%). The fraction of adolescents with serum TC at borderline or high levels (≥ 5.2 mmol/L) was similar between urban and rural areas.

The proportion of females (12%) with borderline levels of serum LDL-C (2.86- 3.35 mmol/L) was significantly greater (p=0.025) than the proportion of males (7%). In addition, the proportion of adolescents with borderline LDL-C levels was lower, but not significant, in rural area than in urban area.

TABLE 3
Classification of serum lipids for urban and rural Costa Rican adolescents based on the National Cholesterol Education Program guidelines (n=322)

Parameter	Gender		p*	Males		p*	Females		p*	Total		p*
	Males (n=166)	Females (n=156)		Urban (n=87)	Rural (n=79)		Urban (n=83)	Rural (n=73)		Urban (n=170)	Rural (n=152)	
Total cholesterol mmol/L												
<4.42	84.9	70.2	0.027	79.3	81.3	NS	66.3	72.6	NS	75.3	79.7	NS
4.42-5.17	13.3	26.0	0.025	13.5	12.7	NS	28.9	20.5	NS	21.2	16.4	NS
≥5.2	1.8	3.8	0.027	7.2	6.0	NS	4.8	6.9	NS	3.5	3.9	NS
HDL cholesterol mmol/L												
<0.91	20.5	7.8	0.002	13.7	27.9	0.038	6.0	9.6	NS	10.0	19.0	NS
0.91-1.17	48.8	55.8	NS	40.3	58.2	0.031	41.0	72.6	0.000	40.6	65.2	0.000
>1.17	30.7	36.4	NS	46.0	13.9	0.000	53.0	17.8	0.000	49.4	15.8	0.000
LDL cholesterol mmol/L												
<2.86	91.0	81.4	0.028	90.8	91.1	NS	79.5	83.6	NS	84.3	87.4	NS
2.86-3.35	7.2	12.2	0.025	6.9	7.6	NS	14.5	9.6	NS	10.1	8.6	NS
≥3.38	1.8	6.4	0.077	2.3	1.3	NS	6.0	6.8	NS	5.6	4.0	NS
Triglyceride mmol/L												
<1.02	29.5	12.2	0.000	27.6	31.6	NS	12.0	12.3	NS	20.0	22.4	NS
1.02-1.46	56.0	65.4	NS	59.8	51.9	NS	67.5	60.3	NS	63.5	55.9	NS
≥1.47	14.5	22.4	NS	12.6	16.5	NS	20.5	27.4	0.002	16.5	21.7	NS

TC: Total Cholesterol, HDL-C: HDL Cholesterol. To convert mmol/L cholesterol to mg/dl multiply mmol/L by 38.7. To convert mmol/L triglyceride to mg/dl, multiply mmol/L by 88.6.

Around 20% of males showed low HDL-C (< 0.91 mmol/L) levels. This prevalence was significantly higher ($p=0.002$) than that observed in females (8%). The prevalence of adolescents with borderline HDL-C levels (0.91-1.17 mmol/L) was significantly higher in rural than in urban areas (65% and 40 % respectively, $p= 0.000$).

The prevalence of borderline triglyceride levels (1.02-1.46 mmol/L) was 60%, with no differences between gender and area. However, the proportion of rural females with high triglyceride levels (≥ 1.47 mmol/L) (27%) was significantly ($p=0.002$) higher than the proportion of urban females (20%). Over 45% of adolescents studied presented both levels of triglyceride higher than 1.02 mmol/L and levels of HDL-C lower than 1.17 mmol/L.

Multiple regression analysis

Linear regression models with TC, HDL-C, LDL-C and TG as dependent variables are presented in Table 4. These regression models explained about 15% of the variance in Costa Rican adolescents' lipid profiles.

TABLE 4
Regression models with Total Cholesterol, HDL-C, LDL-C and Triglyceride as dependent variables

Independent variables	Estimated coefficient	95% CI
Total cholesterol		
Age	-0.003	-0.045, 0.039
Gender	-0.217	-0.377, -0.057
BMI	0.022	-0.001, 0.046
Area	0.085	0.001, 0.004
Cardiovascular fitness score	0.002	6.33E-04, 0.003
constant	2.753	
$R^2 = 0.1640$		
HDL- cholesterol		
Age	0.005	-0.007, 0.172
Gender	-0.062	-0.108, 0.015
BMI	-0.015	-0.022, -0.009
Area	0.103	0.062, 0.144
Cardiovascular fitness score	-3.88×10^{-4}	-1.08×10^{-5} , -7.87×10^{-4}
constant	1.181	
$R^2 = 0.2120$		
LDL- cholesterol		
Age	0.002	-0.038, 0.042
Gender	-0.089	-0.240, 0.061
BMI	0.029	0.007, 0.052
Area	-0.016	-0.150, 0.117
Cardiovascular fitness score	0.003	0.001, 0.003
constant	0.727	
$R^2 = 0.1439$		
Triglyceride		
Age	-0.020	-0.044, 0.005
Gender	-0.003	-0.096, 0.089
BMI	0.019	0.006, 0.033
Area	-0.048	-0.130, 0.034
Cardiovascular fitness score	0.001	4.31×10^{-4} , 0.002
constant	0.729	
$R^2 = 0.0855$		

BMI: Body Mass Index.

Using TC as the dependent variable after adjustment for age, a significant independent positive relationship with cardiovascular fitness score (95% CI 0.001, 0.004) and a negative relationship with gender was found. Mean TC was 0.217 mmol/L (95% CI -0.377, -0.057) lower than females. A similar model with HDL-C as the dependent variable showed a significant independent negative relationship with gender (95% CI -0.108, -0.015), BMI (95% CI -0.022, -0.009) and cardiovascular fitness score (95% CI 1.08×10^{-5} , 7.87×10^{-4}). Mean HDL-C was 0.062 mmol/L lower than in females. Likewise this regression model showed a positive relationship with area (95% CI 0.0062, 0.144). Mean HDL-C was 0.103 mmol/L higher in urban adolescents than in rural youngsters.

With LDL-C as the dependent variable, after adjustment for age, levels were positively related to BMI (95% CI 0.073, 0.052), cardiovascular fitness score (95% CI 0.001, 0.003). Likewise these variables were positively related to triglyceride when this lipid was used as the dependent variable in the regression model.

A variable for the evaluation of the interaction between gender, area, and lipid levels was created and incorporated in the different regression models, even though no statistical significance was found.

No dietary variable showed to be an important predictor for serum lipid levels.

DISCUSSION

LDL-C levels have been linked to early arterial lesion in the aorta and the coronary arteries (1-7), and the measurements in young people are powerful predictors of CAD in middle-age people (6). From this viewpoint, the low prevalence of high LDL-C levels observed in Costa Rican adolescents may suggest a slow progression of atherosclerosis and therefore a low risk of CAD. However, as compared to the United States, the plasma lipid profile among Costa Ricans was more atherogenic. The LDL/HDL ratios show that Costa Rican adolescents have higher ratios in both males and females (2.4 and 2.3) as compared to their United States counterparts (1.9 and 1.9) (19). The LDL/HDL ratio is the variable that most clearly would predict the increased CAD risk for Costa Rican adolescents' (20). Therefore, these data suggest that Costa Rican adolescents may be at an increased risk of CAD as compared to adolescents in the United States.

Additionally, the high proportion of adolescents with borderline-high levels of triglyceride and borderline-low HDL-C levels (around 47%) is worrisome. Data from the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study and the Helsinki Heart Study suggest that the combination of high triglyceride and low HDL-C levels constitutes a powerful risk factor for non-fatal myocardial infarction or CAD death, that would escape attention if LDL-C levels alone were

determined (21-23).

This situation is worrisome since it may indicate a trend toward further future increases in the prevalence of CAD in Costa Rica. The Bogalusa Heart Study suggests that over 70% of children with adverse lipid profiles tend to remain so as young adults (9).

These results could reflect the Costa Rican adolescents' dietary habits. Populations that habitually consume low-fat and high-carbohydrate diets usually have low HDL-C and high triglyceride levels (24). The adolescents' diet presents a total fat and total carbohydrate intake that ranges between recommended levels (30% kcal from total fat and 55-60% Kcal from total carbohydrates). Nevertheless, sucrose intake was as high as that reported by the Bogalusa Heart study; around 20% of the total energy (twice the established recommendation, $\leq 10\%$ kcal) (25). Elevated sucrose intakes increase the hepatic production of triglyceride and generates a reduction in the half-life of the HDL-C particles (26,27).

A high prevalence of low HDL-cholesterol (< 1.0 mmol/L) was found in the rural areas. This may also be a consequence of the lower saturated fat intake observed in these areas (around 10 g/day less than urban areas). Several new and sometimes controversial concepts have arisen that challenge the assumptions underlying the Keys-Hegsted regression equations. Although saturated fats as a class raise LDL, they also appear to have primary responsibility among dietary fatty acids for raising HDL-C (28,29), possibly by translational and posttranslational mechanism (30).

The no association between dietary intake and serum lipids levels found among adolescents, may be a consequence of the methodological difficulty in measuring nutrient intake. However, it has been postulated that above a certain "ceiling" level of dietary components, variability in serum lipids reflects individual metabolic variations rather than differing dietary intake (31).

Low HDL-C is also usually associated with a lack of physical activity (32). In this report a significantly independent relationship between these variables was found. This is worrisome, as 31% of adolescents with borderline HDL-C levels were sedentary. Multiple evidence suggests that exercise may favorably affect the levels of triglyceride, HDL-C, apolipoprotein A, apolipoprotein B and the size and density of HDL particles (4,5,32)

The trend toward low HDL-C and high triglyceride levels in urban and rural adolescents could be also owe to the mestizo genetics of Costa Ricans (23). A similar pattern has been observed in the Pima Indians, the Tarahumara Indians and in Mexican Americans (33-35). This may also explain why the Costa Rican adolescents' present lower HDL-C levels (Figures 1 and 2), compared with other similar adolescents from the US, Venezuela and Spain whose sucrose intake is similar to the described one (10,36,37). On the contrary,

triglyceride levels tend to be significantly higher in Costa Rican youngsters.

FIGURE 1

Comparative serum lipids percentiles for adolescents males

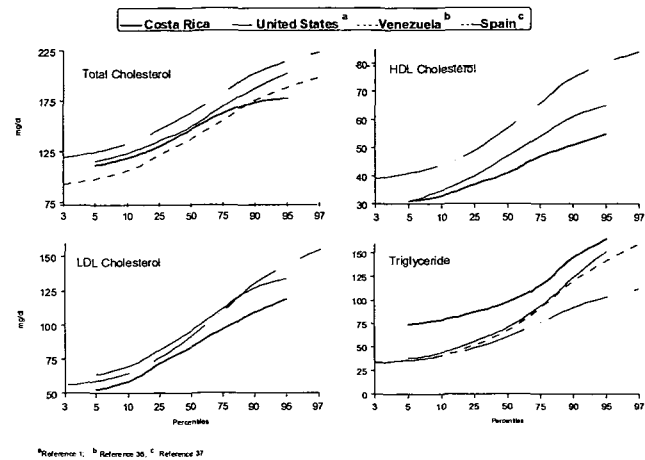
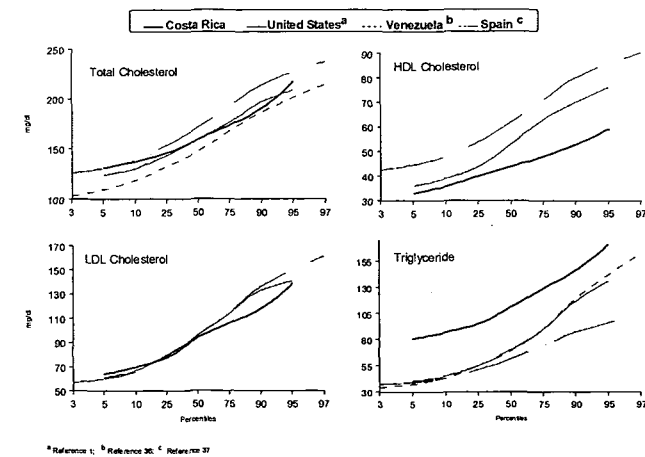


FIGURE 2

Comparative serum lipids percentiles for adolescents females



Considering the lipid profile presented by Costa Rican adolescents, it could be predicted that these youngsters might be at high CAD risk if they increase the prevalence of other risk factors such as high LDL-C, overweight, high saturated fat and sucrose intake and sedentariness. Clustering indicates that each elevated risk factor tends to support the elevation of others (38). This is particularly important, since it has been observed that when LDL-C levels increase, the CAD risk raises 2.5 times approximately in individuals with high triglyceride levels (39). Likewise obesity, especially central

type in presence of high triglyceride levels represents an important predictor for diabetes mellitus development (40).

In this regard, the high prevalence of sedentariness (53%), high saturated fat intake (37%), high sucrose intake (95%) and overweight (22%) found in this study is worrying. This is very important since, according to the regression model, for each Kg/m² of increase on the BMI, the LDL-C levels will raise 0.029 mmol/L and the HDL-C will decrease 0.015 mmol/L. Likewise, for each pulse of increase on the cardiac frequency (high cardiovascular fitness score), the HDL-C will diminish 3.88 x 10⁻⁴ mmol/L and the LDL-C levels will raise 0.003 mmol/L.

These results suggest the urgent need of developing primary intervention programs, oriented to modify Costa Rican adolescents' eating and physical activity pattern. A school-based health promotion program of exercise and health lecture-discussion could be beneficial, as several researchers have suggested (41,42). This is vital, because in Costa Rica the prevalence of obesity increases after childhood (43), therefore the risk for CAD could be increased.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks Dr. Marco Vargas, Dr. Brenda Martínez and Jorge Astúa for their help with blood sample collection and lipid determination.

REFERENCES

- National Cholesterol Education Program. Report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics* 1992; 89:528-37.
- Berenson G, Wattigney W, Bao W, Srinivasan S, Radhakrishnamurthy BI. Rationale to study the early natural history of heart disease: The Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci* 1995; 310:S22-S28.
- Cornhill JF, Herderick E, Vince DG. The clinical morphology of human atherosclerotic lesions. Lessons from the PDAY study. *Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. Wien Klin Wochenschr* 1995; 107: 540-3.
- Hokamanson J, Austin M. Plasma triglyceride and coronary risk. A meta-analysis. *Circulation* 1993; 88:1-10.
- Criqui M, Heiss G, Cohn R, Cowan L, Suchindran CM, Bangeiwaia S, Kritchevsky S, Jacobs B, O'Grady H, Davis CD. Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1993; 328:1220-5.
- Srinivasan S, Berenson G. Childhood lipoprotein profiles and implications for adult coronary artery disease: The Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci* 1995; 310:S61-S67.
- National Cholesterol Education Program. Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation* 1994; 89: 1333-1445.
- Porkka KU, Viikari JS, Akerblom HK. Tracking of serum HDL-cholesterol and other lipids in children and adolescents: The cardiovascular risk in young Finns study. *Prev Med* 1991; 20: 713-24.
- Webber LS, Srinivasan SR, Wattigney WA, Berenson GS. Tracking of serum lipids and lipoproteins from childhood to adulthood: The Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 884-99.
- Lauer R, Lee J, Clarke W. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: The Muscatine study. *Pediatrics* 1988; 82: 309-18.
- Morice A. Situación de las enfermedades crónicas no transmisibles en Costa Rica. Monografía. INCIENSA: Costa Rica, 1998.
- Dirección General de Estadística y Censos. División territorial administrativa. Costa Rica: DGEC, Costa Rica; 1996.
- Friedwald WT, Levez RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
- Fisch J, Federman D, Talmor N. Preparation of a modified glucose oxidase reagent for the polarographic determination of glucose with the Beckman «Glucose analyzer». *Clin Chem* 1975; 21: 760-761
- Kwiterovich P. The Johns Hopkins complete guide for avoiding heart disease. Beyond cholesterol. The Johns Hopkins University Press: Baltimore; 1989:80-102.
- Aráuz AG. Método de registro de alimentos de tres días. In: Madrigal H, Martínez H (Eds). Manual de encuestas de dieta. México: Instituto Nacional de Salud Pública, 1990. 83-98.
- Bush PJ, Zucherman AE, Theiss PK, taggarat V, Horowitz C, Sheridan M, Walter H. Cardiovascular risk factor prevention in black school children: two year results of the «Know Your Body» program. *Am J Epidemiol* 1989;29: 466-92.
- World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. WHO technical report series. 854. Switzerland: WHO; 1995.
- Hickman TB, Briefel RR, Carroll MD, Rifkind BM, Cleeman JI, Maurer KR. Distributions and trends of serum lipid levels among United States children and adolescents ages 4-19 years: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Prev Med* 1998; 27: 879-890.
- Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willet WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991; 325: 373-351.
- Tenkamen L, Pietelä K, Manninen V, Mänttari M. The triglyceride issue revisited: Findings from the Helsinki Heart Study. *Arch Intern Med* 1994; 154:2714-2720.
- National Institute of Health Consensus Development. Triglyceride, high density lipoprotein and coronary heart disease. NIH Consensus Statement 1992; 10: 1-28.
- De Gruyter M, Hoogerbrugge N, van Rijn MA, et al. Patients with combined hypercholesterolaemia-hypertriglyceridaemia show an increased monocyte-endotelial cell adhesion in vitro. Triglyceride level as a major determinant. *Metabolism* 1991; 40: 1119-21.

24. Campos H, Mata L, Siles X, Vives M, Ordovas J, Schaefer E. Prevalence of cardiovascular risk factors in rural and urban Costa Rica. *Circulation* 1992; 85: 648-58.
25. Nicklas T. Dietary studies of children and young adults (1973-1988): The Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci* 1995; 310:S101-S108.
26. Grungy S. Cholesterol and coronary heart disease. *JAMA* 1986; 20: 2850-58.
27. Mahan LK, Arlin MT. Krause's Food, nutrition and diet therapy (eds). 8th ed. W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1992.
28. Azrolan N, Odaka H, Breslow JL, Fisher EA. Dietary fat elevate hepatic apo A-1 production by increasing the fraction of apolipoprotein A-1 mRNA in the translating pool. *J Biol Chem* 1995; 270: 19833-38.
29. Kesteloot H. Nutrition and health: an epidemiological approach. *Verh K Acad geneeskd Beig* 1993; 55: 399-421.
30. Srivastava RA. Saturated fatty acid, but not cholesterol, regulates apolipoprotein A1 gene expression by posttranscriptional mechanism. *Bioch Mol Biol Int* 1994; 34: 393-402.
31. Berenson G, Srinivasan S, Webber L, Nicklas T, Hunter S, Harsha D, Johnson C, Arbeit M, Dalferes E, Wattigney W, Lawrence M. Cardiovascular risk in early life: The Bogalusa Heart study. The Upjohn Company: Michigan, 1991.
32. Harsha DW. The benefits of physical activity in childhood. *Am J Med Sci* 1995; 310: S3- S7.
33. Howard BV, Davis MP, Petlitt DJ, Knowler WC, Bennet PH. Plasma and lipoprotein cholesterol and triglyceride concentrations in the PIMA Indians: Distributions differing from those of caucasians. *Circulation* 1983; 68: 714-24.
34. Connor WE, Cerqueira MT, Connor RW, Wallace RB, Malinow RM, Casdorph RH. The plasma lipids, lipoproteins and diet of the Tarahumara Indians of Mexico. *Am J Clin Nutr* 1978; 31: 1131-42.
35. Stern Mp, Rosenthal M, Haffner SM, Hazuda HP, Franco LJ. Sex difference in the effects of sociocultural status on diabetes and cardiovascular risk factors in Mexican Americans: The San Antonio heart study. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 834-51.
36. López M, Izaguirre I, Macís C, Moya Z, Mendoza J, Fernández A. Proyecto Victoria: Informe de Avances 1996-1997. Monografía; Caracas, 1997.
37. Elcarte R, Villa J, Sada J, gasco M, Oyarzabal M, sola A, Garcia C, Elcarte T, Ferrer M. Estudio de Navarra (PECNA). Hiperlipidemias. Valores medios y percentilados de lípidos y lipoproteínas en una población infanto- juvenil: Correlación con parámetros antropométricos. *An Esp Pediatr* 1993; 38: 307-15.
38. Myers L, Couhlin S, Webber L, Srinivasan S, Berenson G. Prediction of adult cardiovascular multifactorial risk status from childhood risk factor levels: The Bogalusa heart study. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 919-24.
39. Assman G, Schulte H. Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglyceride to incidence of atherosclerotic coronary artery disease: The PROCAM Experience. *Am J Cardiol* 1992; 70: 733-737.
40. Gidding S. A perspective on Obesity. *Am J Med Sci* 1995; 310: S68- S71.
41. Fardy P, White R, Haltiwanger K, Magel J, Dermott K, Clark L, Hurster M. Coronary disease risk factor reduction and behavior modification in minority adolescents: The PATH Program. *JAH* 1996; 18:247-53.
42. Killen J, Telch M, Robinson T, Maccoby N, Taylor B, Farquhar J. Cardiovascular disease risk reduction for tenth grades: A multiple-factor school based approach. *JAMA* 1988; 220: 1728-33.
43. Ministerio de Salud. Encuesta Nacional de Nutrición 1996: Antropometría. San José: Costa Rica, 1997.

Recibido:17-04-2000

Aceptado: 02-08-2001

Absorción de grasa proveniente de tres fuentes dietarias en ratas con diarrea inducida con lactosa

González E.G., Sanchez G., Cioccia A.M., Hevia, P.

Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

RESUMEN. El déficit energético es uno de los principales contribuyentes al deterioro nutricional durante la diarrea y la grasa es el macronutriente con mayor valor energético, por ello buscamos identificar fuentes dietarias de grasa que presenten una mayor biodisponibilidad durante la diarrea. Con aceite de maíz, mantequilla o grasa de cerdo se prepararon tres dietas controles (con almidón) y tres dietas con 42.8% de lactosa para inducir la diarrea. El ensayo incluyó 48 ratas Sprague-Dawley de 28d de edad y peso inicial de 65.5 ± 5.2 g, distribuidas en 6 grupos que recibieron, durante 15d, las dietas mencionadas. En las ratas sin diarrea (controles), el tipo de grasa no afectó el consumo de dieta, el crecimiento ponderal, ni las pérdidas fecales. El menor crecimiento se observó en las ratas con diarrea, independientemente del tipo de grasa consumida y guardó relación con el bajo consumo de dieta. La absorción de grasas durante la diarrea fue: mantequilla 84%, grasa de cerdo 87% y aceite de maíz 91% y la dieta con este último se asoció a la menor excreción fecal y la mayor absorción de grasa durante los 15d. Considerando que las tres fuentes de grasa son de fácil adquisición y de amplia aceptación y dado que se recomienda el suministro de dietas con mayor densidad energética para el tratamiento nutricional de sujetos con diarrea, el aceite de maíz podría ser usado con mayores beneficios.

Palabras clave: Diarrea, dieta, grasa, aceite de maíz, mantequilla, grasa de cerdo.

SUMMARY. Fat absorption from three different dietary sources in rats with lactose induced diarrhea. Low energy intake is one of the most important factors related to nutritional wasting during diarrheal episodes and fat is the macronutrient with the highest energy value. So we intended to seek dietary fat sources, with the highest bioavailability during diarrheal episodes. Three basal (control) and three 42.8% lactose containing diets, used to induce diarrhea, were prepared with corn oil, butterfat or lard. The assay included 48 Sprague-Dawley rats, 28d of age, initial weights of 65.5 ± 5.2 g, distributed in 6 groups that received the diets during 15d. The different types of fat did not affect diet intake, weight gain or fecal losses in rats without diarrhea (control). Low weight gain was found in rats with diarrhea regardless of the type of fat consumed and was related to low diet consumption. Mean fat absorption during diarrhea was as follows: butterfat 84%, lard 87% and corn oil 91%. The latter was related to lower fecal losses and higher fat absorption during the 15d study. Considering that the three fat sources evaluated are easily purchased and widely accepted, and that nutritional management of subjects with diarrhea includes the intake of energy dense diets, it seems that the use of corn oil in these formulations could offer greater advantages.

Key words: Diarrhea, diet, fat, corn oil, butterfat, lard.

INTRODUCCION

La diarrea de origen infeccioso, ocasiona un deterioro del estado nutricional, en niños, que resulta de una disminución en la ingesta de alimentos, una disminución en la absorción de nutrientes suministrados en la dieta y un incremento en los requerimientos asociado a la infección causante de la diarrea (1, 2). Este mismo deterioro, del estado nutricional, se ha observado en ratas con diarrea producida experimentalmente y ha sido evidenciado a través de un menor incremento de peso corporal y el desgaste de las reservas corporales de grasa y proteína. Analizando los diversos componentes de este deterioro, pareciera que está más relacionado con el bajo consumo energético que con la disminuida absorción e incremento en el requerimiento de energía y nutrientes que acompaña todo proceso diarreico.

Diversos estudios, en poblaciones infantiles con diarrea infecciosa (3-5) y en adultos afectados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, donde hasta un 50% de los afectados presenta trastornos malabsortivos, también apoyan esta observación (6-8).

En niños con un episodio diarreico, la evidencia indica que, la grasa es el nutriente que menos se afecta (5). Así, mientras la absorción de la proteína y carbohidratos disminuye más en los niños con diarreas más severas, la grasa es menos afectada por la severidad de la diarrea. La grasa ofrece entonces una ventaja comparativa frente a otros nutrientes, ya que posee una elevada densidad energética 9 kcal/g (38 kJ/g) y su absorción es independiente de la severidad de la diarrea. Estas condiciones lo convierten en una fuente atractiva cuando se desea incrementar la ingesta energética.

Dado que el deterioro nutricional durante el episodio diarreico es debido, primordialmente, al bajo consumo de alimentos, que se traduce en un baja ingesta energética, para compensar, se ha propuesto aumentar el consumo de grasa (5). Sin embargo, un elemento a considerar, en relación con esta proposición, es la influencia del tipo de grasa en su biodisponibilidad. En el individuo sano, los mecanismos absorptivos no están afectados y la absorción de todo tipo de grasa, independientemente de su procedencia, es superior al 90% (9). Sin embargo, es conocido que el mecanismo de absorción de las grasas difiere según las características de los ácidos grasos constituyentes (10). Así, una fuente de grasa, que presente una mayor proporción de ácidos grasos de cadena corta y media, pudiera ser mejor absorbida y, de esta manera, suministrar mayor cantidad de energía al organismo (11). En este sentido, los trastornos diarreicos, al producir una disminución en la digestibilidad de la grasa dietaria, pudieran ocasionar una mayor disminución en la disponibilidad de grasas de orígenes y características distintas.

Estos planteamientos nos llevaron a suministrar dietas elaboradas con grasa provenientes de diferentes fuentes (aceite de maíz, mantequilla y grasa de cerdo) a ratas con diarrea inducida por lactosa para identificar la fuente de mayor absorción.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se estudiaron 48 ratas Sprague-Dawley, machos, de 28 días, con peso inicial de 65.5 ± 5.2 g, criadas en el Bioterio de la Universidad Simón Bolívar. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en seis (6) grupos de ocho (8) ratas y se mantuvieron individualmente en jaulas metabólicas. Durante el periodo de acondicionamiento de cuatro (4) días, las ratas de todos los grupos recibieron, sin restricción, una dieta basal que cubrió los requerimientos nutricionales (Tabla 1: Aceite de Maíz - Control), luego se les retiró el alimento dejándolas 24 h en ayuno, previo al inicio del experimento. Durante todo el ensayo se vigiló que los animales tuviesen agua disponible en los bebederos colocados en cada jaula.

Dietas

Las dietas suministradas a las ratas se prepararon según las recomendaciones del American Institute of Nutrition (12) usando las cantidades indicadas en la Tabla 1. Se utilizó aislado proteico de soja (Protein Technologies – Supro 500E) como fuente de proteína y se utilizaron tres fuentes de grasa dietaria (aceite de maíz, mantequilla y grasa de cerdo), adquiridas localmente, en la preparación de las diferentes dietas. La grasa fue incorporada al 7% (p/p) en todas las dietas. Con cada tipo de grasa se preparó una dieta control (sin lactosa) y una dieta con lactosa para inducir diarrea. Estas

últimas contenían lactosa en una proporción de 42.8% (equivalente a la sustitución de un 60% del almidón presente en la respectiva dieta control). La dieta en polvo fue colocada dentro de las jaulas correspondientes, en comederos, a los cuales las ratas tuvieron libre acceso durante todo el estudio.

TABLA 1
Composición porcentual de las dietas usadas

Ingredientes (g/100 g dieta)	Control	Diarrea
Aislado proteico de soja	16.4	16.4
Grasa *	7	7
Mezcla de vitaminas AIN-76	1	1
Mezcla de minerales AIN-76	3.5	3.5
Bitartrato de colina	0.2	0.2
Metionina	0.3	0.3
Almidón de maíz	71.3	28.5
Lactosa	-	42.8

* Aceite de maíz, mantequilla o grasa de cerdo.

Ensayo

Posterior al ayuno de 24 h, a tres (3) grupos de ratas se le indujo diarrea mediante la administración de dietas conteniendo lactosa y las diferentes fuentes de grasa. Los otros tres (3) grupos de ratas recibieron dietas controles preparadas con las diferentes fuentes de grasa conteniendo almidón como fuente de carbohidratos. Así un grupo control (almidón 100%) y uno con diarrea (almidón 40% - lactosa 60%) recibieron dieta con aceite de maíz. Otros dos grupos (control y diarrea) recibieron las dietas elaboradas con mantequilla y los dos grupos restantes (control y diarrea) recibieron dietas conteniendo la grasa de cerdo (Tabla 1). El ensayo tuvo una duración de 15 días. Se registró el consumo y variación de peso en las ratas y se hizo colección de heces entre los días 2-4, 7-9 y 13-15 usando mallas de acero inoxidable (13).

En las heces correspondientes a 48 h, secas y molidas se determinó el contenido de grasa total (14) y se estimó la absorción aparente de grasa a partir de la grasa consumida y la grasa excretada durante cada período de colección. La absorción aparente de la dieta y grasa se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

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

Análisis estadístico

Se establecieron diferencias significativas mediante la aplicación de ANOVA de 1 vía (15) y las medias fueron comparadas usando el método de los rangos múltiples de Duncan (16). Se estableció el nivel de significancia del 95% (p < 0.05).

RESULTADOS Y DISCUSION

El estudio tuvo como objetivo identificar la fuente dietaria de grasa con la mejor absorción durante un episodio diarreico inducido en ratas mediante la administración de lactosa en la dieta. Las fuentes dietarias de grasa evaluadas fueron el aceite de maíz, la mantequilla y la grasa de cerdo. Las tres fuentes de grasa evaluadas son de amplio consumo popular y fácilmente asequibles en el mercado local.

Al inicio del experimento todos los animales presentaron un peso similar (Tabla 2) y luego de 15 d no se observó diferencia en el crecimiento ponderal entre las ratas sin diarrea (controles), independientemente del tipo de grasa incorporado en la dieta. De manera similar, tampoco se encontró diferencia significativa en el crecimiento entre las ratas con diarrea inducida por lactosa que recibieron aceite de maíz, mantequilla o grasa de cerdo en sus dietas. En cambio, al comparar las ratas controles con aquellas con diarrea, se observó una disminución en el crecimiento, evaluado a través de las variaciones de peso corporal, a consecuencia del episodio diarreico. Los grupos con diarrea crecieron un 37-48% ($p < 0.05$) menos que sus respectivos grupos control. Los resultados (Tabla 2) mostraron que el retardo en el crecimiento ponderal, que se observó durante la diarrea, estuvo asociado a un menor consumo de alimento. Independientemente del tipo de grasa en la dieta, en comparación con los respectivos grupos controles sin diarrea, las ratas con diarrea inducida por lactosa disminuyeron significativamente su consumo total de alimento en un 35-40% ($p < 0.05$) después de 15 d. Los resultados están de acuerdo con observaciones previas (1,2), en cuanto a que el deterioro nutricional es debido, primordialmente, al menor consumo de alimentos durante el episodio diarreico. Esto destaca la necesidad de proporcionar una mayor cantidad de energía a través de la dieta para aliviar el deterioro nutricional (17,18), para lo cual la grasa ofrece ciertas ventajas sobre los carbohidratos y proteínas, ya que es una excelente fuente de energía y la absorción intestinal de grasa durante episodios diarreicos no disminuye con la misma magnitud (4,5,19). La incorporación de uno u otro tipo de grasa (aceite de maíz, mantequilla, grasa de cerdo) no originó variaciones en el consumo de dieta ni se reflejó en las variaciones de peso corporal.

Durante el experimento la excreción fecal se mantuvo constante en los grupos controles, indistintamente del tipo de grasa consumido (Tabla 3). La excreción de heces expresada en relación con el consumo de alimento indica que, durante el primer período de recolección (días 2-4), los grupos que recibieron lactosa aumentaron sus pérdidas fecales 5.6 a 6.9 veces ($p < 0.05$), en comparación con los respectivos controles. Durante el segundo período de recolección (días 9-11) también se observan mayores masas fecales en los

grupos con diarrea, aunque en menor proporción. La severidad de la diarrea fue disminuyendo progresivamente en las ratas que recibieron las dietas con lactosa. Luego de 15 d recibiendo estas dietas, únicamente las ratas alimentadas con las dietas de aceite de maíz mostraron, una excreción fecal similar a su respectivo grupo control. Las dietas con mantequilla se asociaron a una mayor excreción fecal y por lo tanto a diarreas más severas, durante los 15 d de duración del estudio.

TABLA 2

Peso inicial, variación de peso corporal y consumo de alimento en ratas con diarrea, inducida con lactosa, que recibieron aceite de maíz, mantequilla o grasa de cerdo como fuente de grasa en la dieta

Grupos	Peso Inicial (g)	Crecimiento ponderal (g)	Consumo de alimento (g)
Aceite de Maiz			
Control	65.2±4.4	90.7±14.4 ^b	202.9±23.8 ^b
Diarrea	65.9±4.5	46.8±18.2 ^a	117.9±18.6 ^a
Mantequilla			
Control	65.6±6.3	86.9±18.3 ^b	196.1±33.2 ^b
Diarrea	65.2±6.3	54.7±15.8 ^a	127.2±4.8 ^a
Cerdo			
Control	65.6±4.3	85.4±5.3 ^b	202.5±10.8 ^b
Diarrea	65.2±6.5	53.7±10.4 ^a	117.6±43.5 ^a

Los valores representan media ± desviación estándar de $n = 8$. Letras diferentes (a-b) indican diferencia estadística según ANOVA 1 vía con una significancia del 95 % ($p < 0.05$).

En estudios previos, se ha demostrado que las ratas se adaptan a la lactosa contenida en elevada proporción en la dieta (13). En el presente trabajo, la adaptación fue observada con mayor rapidez en las ratas que recibieron las dietas con aceite de maíz, en cambio, demoró más en aquellas que recibieron dietas con mantequilla.

La Figura 1 muestra la absorción aparente de grasa en cada uno de los períodos de recolección. Se observa que todos los grupos que recibieron lactosa mostraron una menor absorción de grasa a los 4 días ($p < 0.05$). Sin embargo, el grupo que recibió aceite de maíz aumentó su absorción antes que el grupo asignado a grasa de cerdo. El grupo que recibió mantequilla mostró disminuciones importantes en la absorción de grasa al inicio y final del estudio. Por otro lado, el grupo que recibió grasa de cerdo mantuvo una baja absorción de grasa en comparación con el respectivo grupo control, pero con un nivel de absorción superior al observado con la dieta de mantequilla.

TABLA 3

Excreción de heces húmedas (mg/g dieta) por las ratas controles y con diarrea, inducida con lactosa, que recibieron aceite de maíz, mantequilla o grasa de cerdo como fuente de grasa en la dieta durante los días 2-4, 9-11 y 13-15 del ensayo

Grupos	Período de Recolección (días)		
	2-4	9-11	13-15
Aceite de Maíz			
Control	29.46±7.22 ^a	28.67±8.40 ^a	34.56±10.39 ^a
Diarrea	163.56±89.88 ^b	108.14±74.52 ^{ab}	61.21±24.02 ^{ab}
Mantequilla			
Control	30.37±3.44 ^a	33.80±5.72 ^a	27.47±5.63 ^a
Diarrea	208.22±147.10 ^b	235.14±167.95 ^c	140.35±99.35 ^c
Cerdo			
Control	30.39±4.08 ^a	32.41±3.66 ^a	26.57±5.61 ^a
Diarrea	201.30±108.65 ^b	153.97±98.65 ^{bc}	83.54±42.22 ^b

Los valores representan media ± desviación estándar de n = 8. Letras diferentes (a-c) indican diferencia estadística según ANOVA 1 vía con una significancia del 95 % (p < 0.05).

La asociación entre la severidad de la diarrea y el tipo de grasa se hizo evidente al realizar un análisis de regresión entre los tipos de grasa y su absorción aparente. La Figura 2 muestra, con un coeficiente de correlación de 0.74 (p<0.05), que la diarrea más severa, observada en las ratas que recibieron mantequilla como fuente de grasa, se asoció a una menor absorción aparente de grasa (p<0.05). En cambio, el grupo de ratas que recibió aceite de maíz en la dieta, mantuvo niveles elevados de absorción de grasa. La Figura 2 muestra que la grasa proporcionada por el aceite de maíz se absorbe mejor que la de cerdo y que ésta, a su vez, es mejor utilizada que la mantequilla. El aceite de maíz ofrece un mayor beneficio cuando se considera la menor severidad de la diarrea y la mayor tasa de absorción de grasa durante el estudio.

La mantequilla posee un elevado contenido de ácidos grasos de cadena media (6-12 carbonos), los cuales son absorbidos con facilidad por la mucosa intestinal intacta (10). Sin embargo, en las ratas con diarrea inducida por lactosa no se observó esta ventaja. Mas bien, la mantequilla se asoció a una mayor severidad de la diarrea durante mayor tiempo y a una menor absorción de grasa. La grasa de cerdo, que se caracteriza por su elevado contenido en grasas saturadas (10), fue mejor aprovechada que la mantequilla durante la diarrea inducida con lactosa.

FIGURA 1

Absorción aparente de aceite de maíz, mantequilla y grasa de cerdo medida en ratas controles y con diarrea inducida con lactosa

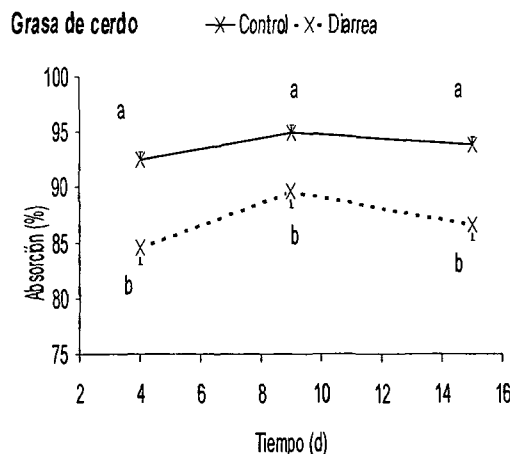
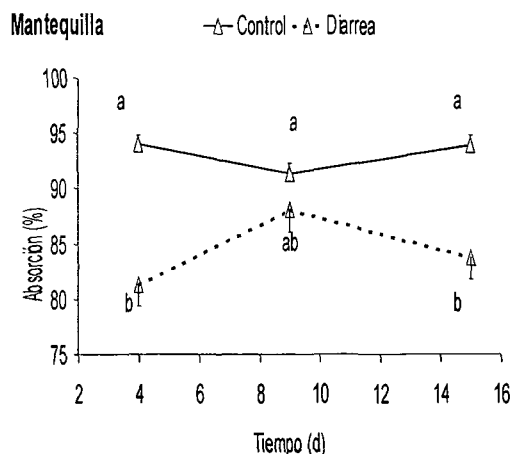
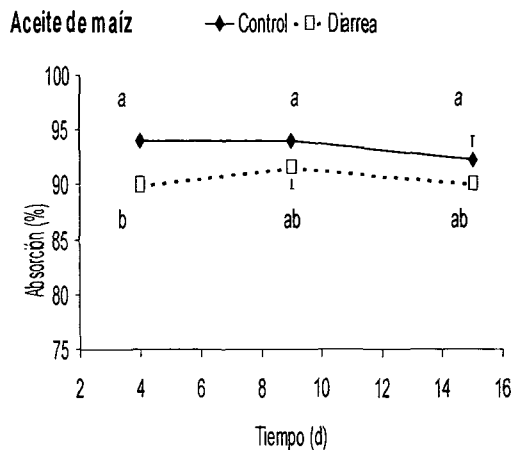
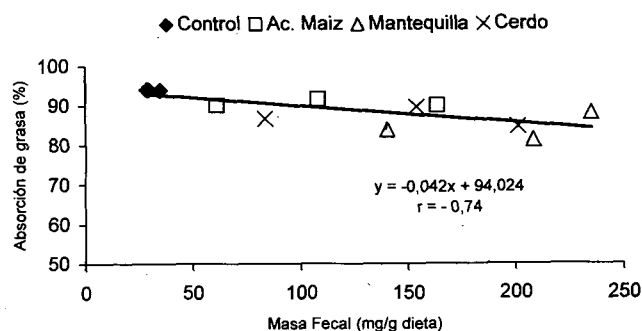


FIGURA 2
Efecto de la severidad de la diarrea sobre la absorción aparente de las grasas estudiadas



Las diferencias en la absorción observadas, con las distintas fuentes de grasa dietaria en este estudio, pudieran explicarse por la composición de ácidos grasos presentes en cada tipo de grasas. La mantequilla posee un 65% de ácidos grasos saturados, en cambio la grasa de cerdo presenta un 42% y el aceite de maíz, tan solo un 13% (10). Aun cuando, es conocido que la mantequilla posee una proporción importante de ácidos grasos saturados de cadena corta y media, cuya absorción se inicia en el estómago y no depende de la formación de micelas (10), la absorción de la grasa de cerdo y del aceite de maíz fue más eficiente. La mayor eficiencia en la absorción de los ácidos grasos del aceite de maíz podría ser debido a varias razones. Los triglicéridos con ácidos grasos saturados en las tres posiciones no son buenos sustratos para la lipasa pancreática (20). También, la lipasa lingual tiene preferencia por triglicéridos que contienen ácidos grasos poliinsaturados ocupando la posición sn-3 (10). Adicionalmente, la eficiencia del proceso absorptivo aumenta acorde con el grado de insaturación de los ácidos grasos (10). Por otro lado, existen evidencias de que los triglicéridos con ácidos grasos de cadena media, como los contenidos en la mantequilla, en comparación con los ácidos grasos de cadena larga, no son absorbidos tan rápidamente en las porciones proximales del intestino delgado (21).

Nuestros resultados muestran que el aceite de maíz puede ser un ingrediente de gran importancia en la dieta durante el episodio diarreico, por su mejor absorción y alto aporte energético (9 kcal/g). En el tratamiento de las diarreas y para la recuperación del estado nutricional se recomienda el suministro de dietas con una elevada densidad energética (11,17,18,22). El incremento de la densidad energética de la dieta con el uso de aceite de maíz constituye una manera fácil y efectiva para lograr un mayor aporte de energía sin empeorar el cuadro diarreico. Otra posible ventaja, del aceite de maíz, podría derivarse del hecho de que el estado

nutricional de la vitamina E está comprometido durante el episodio diarreico (13). El aceite de maíz posee un elevado contenido de vitamina E (23), por lo cual, su incorporación en la dieta del sujeto con diarrea, podría servir para disminuir el deterioro detectado en el estado nutricional de esta vitamina (13).

Finalmente, estos resultados indican que, el modelo de diarrea inducida con lactosa en ratas permite diferenciar los efectos del proceso diarreico sobre la disponibilidad de la grasa proveniente de diversas fuentes. Esto sugiere que el modelo podría ser útil en el estudio de la disponibilidad de otros nutrientes en situaciones de diarrea. A su vez, esta información podría servir como punto de partida en el diseño de fórmulas o dietas más adecuadas para el tratamiento nutricional de la diarrea.

REFERENCIAS

1. Mata L. Diarrheal disease as a cause of malnutrition. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(1):16-27.
2. Guerrant RL, Schorling JB, McAuliffe JF, De Sousa MA. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(1 Suppl.):28-35.
3. Moy RJ, de C Marshall TF, Choto RG, McNeish AS, Booth IW. Diarrhoea and growth faltering in rural Zimbabwe. *Eur J Clin Nutr* 1994;48(11):810-21.
4. Hevia P, Carías D, Cioccia AM, González E. Diarrea y nutrición: experiencias en niños y ratas. *Anales Venezolanos de Nutrición* 1998;11(1):28-36.
5. González EG, Piñero D, Römer H, Guerra M, Hevia P. Alternativas para la alimentación durante la diarrea aguda. *Arch Ven Puericul Pediatr* 1992;55(1):16-19.
6. Carbonnel F, Beaugerie L, Abou Rached A, D'Almagne H, Rozenbaum W, Le Quintrec Y, Gendre JP, Cosnes J. Macronutrient intake and malabsorption in HIV infection: a comparison with other malabsorptive states. *Gut* 1997;41(6):805-10.
7. Beaugerie L, Carbonnel F, Carrat F, Rached AA, Maslo C, Gendre JP, Rozenbaum W, Cosnes J. Factors of weight loss in patients with HIV and chronic diarrhea. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;19:34-9.
8. Stockmann M, Fromm M, Riecken E, Schulzke J. Nonmalabsorptive mechanisms of diarrhea in HIV infection. *Pathobiology* 1998;66(3-4):165-9.
9. Linscheer WG, Vergoesen AJ. Lipids. En: (edit.) Shils ME, Olson JA, Shike M. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8ª ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1994.
10. Jones PJH, Kubow S. Lipids, Sterols and Their Metabolites. En: (edit.) Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9ª ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1999.
11. Jirapinyo P, Young C, Srimaruta N, Rossi TM, Cardano A, Leblenthal E. High-fat semielemental diet in the treatment of protracted diarrhea of infancy. *Pediatrics*, 1990;86(6):902-8.

12. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1977;107:1340-8.
13. Liuzzi JP, Cioccia AM, Hevia P. In well-fed young rats, lactose-induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamins A and E and affects preferentially vitamin E status. *J Nutr* 1998;128:2467-2472.
14. Blight EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1958;37:911.
15. Steel RG, Torrie JH. *Bioestadística: Principios y procedimientos*, 2ª ed. McGraw Hill, México, 1988.
16. Duncan DB. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 1955;11:1-6.
17. Rahman MM, Islam MA, Mahalanabis D, Biswas E, Majid N, Wahed MA. Intake from an energy-dense porridge liquefied by amylase of germinated wheat: a controlled trial in severely malnourished children during convalescence from diarrhea. *Euro J Clin Nutr* 1994;48:46-53.
18. Schroeder DG, Torun B, Bartlett AV, Miracle-McMahill H. Dietary management of acute diarrhea with local foods in a guatemalan rural community. *Acta Paediatr* 1997;86(11):1155-1161.
19. Abbas KA, Bilal R, Sajjad MI, Latif Z, Mirza NH. Fat absorption in persistent diarrhoea using ¹³C-labelled trioctanoin breath test. *J Trop Pediatr* 1999;45(2):87-94.
20. Grundy SM. Grasa Alimentaria. En: (edit.) Ziegler EE, Filer LJ. *Conocimientos actuales sobre nutrición*, 7ª ed. International Life Sciences Institute / Organización Panamericana de la Salud. Publicaciones Científicas Nro. 565, Washington, 1997.
21. Vu MK, Verkijk M, Muller ES, Biemond I, Lamers CB, Masclee AA. Medium chain triglycerides activate distal but not proximal gut hormones. *Clin Nutr* 1999;18(6):359-63.
22. Moran JR, Diener U. Meeting lipid needs of infants with allergy and gastrointestinal diseases. *Eur J Med Res* 1997;2(2):84-7.
23. Dupont J, White PJ, Carpenter MP, Schaefer EJ, Meydani SN, Elson CE, Woods M, Gorbach SL. Food uses and health effects of corn oil. *J Am Coll Nutr* 1990;9(5):438-70.

Recibido:24-10-2000

Aceptado: 26-07-2001

Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats

Egle M.A. Siqueira, Sandra F. Arruda; Lucilene M. de Sousa and Elizabeth M.T. de Souza

Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, Universidade de Brasília. Brasilia DF. Brazil

SUMMARY. A mixture of cereal bran, eggshells and cassava leaf powder, known as multimixture (MM), has been widely used in developing countries as a dietary supplement to combat malnutrition in children. The introduction of phytate from cereal bran in infant diets has generated serious controversy about MM due to the mineral chelating effect of phytate. This paper reports on a study to investigate the bioavailability of calcium, iron and zinc in rats fed with a deficient diet supplemented with MM. Undernourished rats were treated with a deficient diet (DD) to which MM containing different phytate and mineral concentrations was added. Body weight gains, Ca, Fe, Zn and phytate balances, blood hemoglobin concentration and the mineral content of tissue were determined. DD supplemented with 5% and 25% of MM increased the rats' hemoglobin blood concentration, fur regrowth, Ca concentration in the femur and promoted body weight gain 40 times higher than did the DD. Extra calcium, iron and zinc added to the diet with 25% of MM did not increase the rats' growth rates. Both the addition of NaCl, KF and KI in MM and the use of dephytinized bran in the MM composition led to a significant increase in the rats' growth ($P < 0.0001$); however, these changes failed to increase Ca, Fe and Zn bioavailability. Our findings suggest that the Ca, Fe and Zn bioavailability was not affected by the MM phytate content or by the concentrations of NaCl, KF and KI in the diet.

Key words: Cereal bran, phytate, bioavailability, minerals.

RESUMEN. El fitato de una dieta suplementaria alternativa, no tiene efecto sobre el estatus del calcio, hierro y zinc en ratas subnutridas. Una mezcla de salvado de cereal, cáscara de huevo y hoja de mandioca en polvo, conocida como multi-mezcla (MM), ha sido ampliamente utilizada en países sub-desarrollados como suplemento de la dieta para combatir la desnutrición en niños. La introducción de fitato proveniente de salvado de cereal en dietas para bebés ha generado serias controversias acerca de la MM debido al efecto quelante de minerales por parte del fitato. Este artículo describe un estudio llevado a cabo para investigar la bio-disponibilidad de calcio, hierro, y zinc en ratas alimentadas con una dieta deficiente suplementada con MM. Ratas sub-alimentadas se trataron con una dieta deficiente (DD) a la cual se le agregó una MM conteniendo diversas concentraciones de fitato y minerales. Se determinó el aumento de peso corporal, Ca, Fe, Zn, balance de fitato, concentración de hemoglobina en la sangre y el contenido mineral de los tejidos. La DD suplementada con 5% y 25% de MM aumentó la concentración de hemoglobina en la sangre de las ratas, crecimiento del pelo, concentración de Ca en el fémur y promovió un aumento de peso corporal 40 veces mayor que con DD. Extra calcio, hierro y zinc agregados a la dieta con 25% de MM, no aumentó la velocidad de crecimiento de las ratas. Tanto la adición de NaCl, KF y KI en la MM así como el uso de salvado sin fitato en la composición de la MM produjeron un aumento significativo en el crecimiento de los animales ($P > 0.0001$); sin embargo, estos cambios fallaron en aumentar la bio-disponibilidad del Ca, Fe y Zn. Nuestros resultados sugieren que la bio-disponibilidad del Ca, Fe y Zn no fue afectada por el contenido de fitato en la MM o por las concentraciones de NaCl, KF y KI en la dieta.

Palabras clave: Salvado de cereal, fitato, bio-disponibilidad, minerales.

INTRODUCTION

Malnutrition in Brazil among children under 5 years of age dropped by over 60% between 1975 and 1989 (1). However, this drop was less accentuated in low income communities in the rural areas of the north and northeast due to their remoteness from the agricultural productive areas. An alternative program to fight malnutrition has therefore been proposed. This program consists of using byproducts such as cereal bran, powdered cassava leaves, eggshells,

sesame and squash seeds as dietary supplements, known as multimixture (MM). Due to its rich chemical composition, the MM has been considered a potential source of both vitamins (thiamin, riboflavin, A, E) and minerals (Ca, Fe and Zn). Reduced infantile malnutrition has been reported in communities that received MM (2); however, no scientific study has yet been made demonstrating nutritional improvements promoted by MM supplementation or by other factors simultaneously introduced with MM, such as improved sanitary conditions or/and educational campaigns

focusing on mothers. Moreover, the presence of phytate in the composition of bran has given rise to doubts about the bioavailability of minerals in MM (3). Studies are needed to confirm the nutritional benefit of MM (4,5). Phytate, a highly charged inositol molecule, is a powerful multivalent metal ion chelator, which may impair the absorption of minerals in diets (6). However, phytate may be cleaved by phytase present in plants, microorganisms or the intestines of some animals (7,8), producing lower phosphoric esters and, thus, eliminating its metal chelating action (7). Considering that the supplementation of diets with MM increases both mineral and phytate intake, we proposed to investigate the bioavailability of calcium, iron and zinc from the MM in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Forty-two male Wistar rats at 21 d, body weight mean 36.3 ± 1.8 g, from Bioplan, Brasília, Brazil, were separated into seven groups and housed in individual stainless steel cages, under a 12:00 h light:dark cycle, at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Feces were collected using a nylon net at the bottom of the cages to allow the urine to become separated from the feces. The animal protocol was approved by the Universidade de Brasília's Ethical Committee for the use of Animals. **Diets:** The deficient diet (DD) was prepared with cooked polished rice with soybean oil (50g per kg of rice). The multimixture (MM) was prepared with (g/kg): 350 wheat bran, 350 rice bran, 210 cassava leaf powder, and 90 eggshell powder, the proportions and main constituents of MM used by children's Affairs in Brazil (Pastoral da Criança - CNBB) to combat malnutrition. The six test diets contained DD supplemented with MM added in different proportions of minerals and phytate (g/kg): (5) 50 MM; (25) 250 MM; (25-PS) 250 MM, 112 CaCO_3 , 1.2 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (25-AS) 250 MM, 1.3 NaCl, 0.198×10^{-3} KI and 0.003 KF, these elements was added to diet 25 due to their low level found in MM constituents as well as in the DD; (25-LPC) 250 MM with low phytate content. The AIN-93G (9) was used as a reference diet (RD). **Treatment:** All the rats were fed the deficient diet for 15 d to induce malnutrition, which was characterized by a significantly lower body weight gain (4g per 15 d), partial loss of fur, associated to apathy when compared to reference rats (27g per 15 d). The undernourished rats were divided into seven groups (6 rats/group) and allowed free access to one of the experimental diets and distilled water for 28 d. Daily food consumption and fecal excretion were recorded twice a week and body weight once a week. The rats were anesthetized and blood was collected from the heart to determine blood hemoglobin

concentrations and hematocritic values. The pancreas and both femurs were removed, weighed and frozen at -70°C for subsequent determination of Ca, Fe and Zn contents. **Phytate reduction process:** Commercial rice and wheat bran (315g of each) were soaked for 24 hours in 3.78 L of an aqueous solution of sodium acetate buffer (50mmol/L, pH 5.15) at 55°C , with simultaneous stirring (44 rpm). This process reduced 79,5% of the concentration of native phytate in the bran. **Analytical methods:** Total protein contents were determined by the Kjeldahl method (10) while total lipids by the Soxhlet method (11). Minerals were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP - AES / Spectro, Kleve, Germany). The calibration curves standardized for Titrisol (Merck) were linear in the ranges of 0-250 mmol/L, 0-17.9 mmol/L, 0-15.3 mmol/L and 0-9.7 mmol/L for Ca, Fe, Zn and P, respectively. The precision of this method was better than 2% of the mean. Diet and feces samples were prepared by Jorhem's method (12), pancreas samples by the method of Hartiti et al. (13) and femur samples by the method of Franz et al. (14). The phytate content in the diet and feces was measured according to Latta & Eskin (15) Total reducing sugars were determined by the dinitrosalicylic acid method (16). Hematocrit and hemoglobin were determined using a cell counter (COULTER T-890 from Coulter Corporation, Miami, Florida). The precision of this method was better than 2% of the mean. **Statistical Analysis:** The results are expressed as mean \pm SEM, and statistical differences were determined by ANOVA with Bonferroni correction (17), using the Stats 95 program. Data that did not meet the assumption of equal variance were log-transformed before statistical analysis and reconverted to antilogarithms to recover the original units.

RESULTS

Diets composition

All the test diets contained about 16 MJ/kg and were protein deficient. 5% of MM added to the deficient diet increased the calcium, iron and zinc contents; however, these nutrients recommended for rats (AIN-93G) were supplied with a total of only 25% of MM (Table 1). Molar phytate:calcium (PA:Ca), phytate:iron (PA:Fe) and phytate:zinc (PA:Zn) ratios were calculated for each test diet. All test diets had molar ratios lower than reported critical values for PA:Ca and PA:Fe (19, 20). Molar ratio higher than reported critical values for PA:Zn (20) was found in 25 and 25-AS diets.

TABLE 1
Composition of diets and nutrient recommendations of the American Institute of Nutrition, for rats (AIN-93G)

Diet	DD	5	25	25-PS	25-AS	25-LPC	MM AIN-93G recommended
Energy (MJ)*	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	20.0
Lipids (g) †	56	63	71	71	71	58	196
Protein (g) †	72	75	88	88	88	88	137
Ca (g) †	0.2	2.7	12.5	23.7	12.5	12.4	49.4
Fe ² (mg) †	11	26	85	147	85	78	307
Zn ² (mg) †	22	27	47	106	47	37	121
Na (mg) *	166	162	145	145	695	145	87
P (g) †‡	1.0	2.6	8.5	8.5	8.5	6.15	31
Phytate(g) †	-	1.1	4.8	4.8	4.8	0.98	19.3

*Content was calculated considering data cited by Madruga (18).

† Analysis determined in the present study.

‡ Nonphytate P, calculated by the difference between total P minus phytate P. (DD) Deficient Diet; Test diets contained DD supplemented (g/100g): (5) MM 5; (25) MM 25; (25-PS) MM 25, CaCO₃, FeSO₄ and ZnSO₄; (25-AS) MM 25, NaCl, KI and KF; (25-LPC) dephytinized MM 25; (RD) Reference Diet.

Mineral and phytate balance

Mineral and phytate balance (21) was defined in this study as the difference between intake and fecal excretion (I-FE difference) in a period of 24:00 h. Group DD excreted about 50% of the calcium intake and showed a negative balance of iron and zinc (Table 2). All the test groups showed higher a ($P < 0.048$) calcium, iron and zinc balance than group DD. The relative calcium balance (I-FE/I) in Group 5 was not different from the other test groups, while the relative balance of iron and zinc were lower ($P < 0.002$). The increased calcium, iron and zinc balance found in groups 25-PS, 25-AS and 25-LPC in comparison to group 25 was proportional to the amount of dietary intake or to the dietary elements contents, as confirmed by their relative balances shown in Table 2. Group 5 excreted less than 8% of the phytate intake while the other groups excreted over 44% in the two fortnights of the study (Table 3).

TABLE 2
Daily ingestion (I), excretion (FE) and balance (I-FE) of A) calcium, B) iron and C) zinc in undernourished rats fed DD supplemented with multimixture containing different phytate and mineral concentrations*

A) Calcium balance									
Diets	I		FE (mg/d)		I-FE		I-FE/I (%)		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
DD	0.78 ^d	0.09	0.34 ^c	0.08	0.44 ^d	0.08	56.41 ^c	8.50	
5	18.87 ^c	3.73	0.94 ^c	0.76	17.93 ^c	3.86	95.02 ^a	5.00	
25	104.10 ^b	19.34	16.32 ^b	8.48	87.78 ^b	16.06	84.32 ^{ab}	6.70	
25-PS	165.95 ^a	50.53	38.07 ^a	18.57	127.88 ^a	52.18	77.06 ^{bc}	22.80	
25-AS	145.15 ^a	29.95	25.91 ^{ab}	21.08	119.24 ^a	21.83	82.15 ^{ab}	11.80	
25-LPC	154.11 ^a	26.27	34.12 ^{ab}	27.42	119.99 ^a	26.34	77.86 ^{ab}	15.10	
Significance	(P<0.001)		(P<0.036)		(P<0.021)		(P<0.006)		
B) Iron balance									
DD	0.05 ^d	0.01	0.18 ^{ab}	0.08	-0.13 ^d	0.08	-	-	
5	0.20 ^c	0.03	0.09 ^b	0.02	0.11 ^c	0.04	55.00 ^b	11.69	
25	0.72 ^b	0.15	0.19 ^a	0.07	0.53 ^b	0.15	73.61 ^a	9.37	
25-PS	1.09 ^a	0.30	0.19 ^a	0.08	0.90 ^a	0.31	82.57 ^a	9.25	
25-AS	0.95 ^a	0.22	0.14 ^{ab}	0.08	0.81 ^a	0.21	85.26 ^a	7.42	
25-LPC	0.98 ^a	0.14	0.25 ^a	0.13	0.73 ^a	0.13	74.49 ^a	11.93	
Significance	(P<0.014)		(P<0.010)		(P<0.023)		(P<0.0001)		
C) Zinc balance									
DD	0.08 ^c	0.01	0.20 ^{ab}	0.03	-0.12 ^d	0.03	-	-	
5	0.19 ^d	0.04	0.09 ^d	0.03	0.10 ^c	0.06	52.63 ^b	22.23	
25	0.36 ^c	0.04	0.11 ^{cd}	0.03	0.25 ^b	0.03	69.44 ^a	5.85	
25-PS	0.72 ^a	0.17	0.21 ^a	0.05	0.51 ^a	0.18	70.83 ^a	11.02	
25-AS	0.51 ^b	0.11	0.12 ^{cd}	0.02	0.39 ^a	0.09	76.47 ^a	4.38	
25-LPC	0.50 ^b	0.05	0.15 ^{bc}	0.06	0.35 ^a	0.08	70.00 ^a	13.35	
Significance	(P<0.047)		(P<0.006)		(P<0.048)		(P<0.002)		

*Average and standard errors for n = 48 (six rats per group, eight records per rat). Column not sharing a common superscript are significantly different. Data were log-transformed before statistical analysis. Please refer to Table 1 for abbreviations

TABLE 3

Phytate ingestion (I), excretion (FE) and balance (I-FE) of undernourished rats fed DD added multimixture containing different phytate and mineral concentrations *

	Fortnight 1								Fortnight 2							
	I		FE		I-FE		I-FE/I		I		FE		I-FE		I-FE/I	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
5	7.4 ^b	0.6	0.2 ^c	0.06	7.2 ^b	0.6	97.6 ^a	0.7	8.6 ^d	0.8	0.6 ^c	0.1	8.0 ^b	1.2	92.4 ^a	4.1
25	38.2 ^a	5.8	22.3 ^a	4.3	15.9 ^a	3.1	41.5 ^c	5.8	43.2 ^b	11.7	25.7 ^b	5.1	17.5 ^a	11.5	40.4 ^b	13.3
25-PS	36.4 ^a	13.9	16.4 ^a	8.5	20.0 ^a	7.2	54.9 ^c	9.9	35.6 ^b	9.6	18.9 ^c	4.4	16.7 ^{ab}	10.1	47.0 ^b	17.2
25-AS	41.1 ^a	8.7	19.9 ^a	8.0	21.2 ^a	6.3	51.6 ^c	14.1	67.8 ^a	8.2	34.5 ^a	1.4	33.3 ^a	11.8	46.1 ^b	9.2
25-LPC	9.1 ^b	0.8	4.5 ^b	1.0	4.6 ^c	1.3	50.7 ^c	12.4	13.3 ^c	1.4	8.5 ^d	2.4	4.8 ^b	2.5	36.4 ^b	15.9
Significance	(P<0.000)		(P<0.025)		(P<0.043)		(P<0.025)		(P<0.009)		(P<0.043)		(P<0.044)		(P<0.02)	

Average and standard errors for n = 24 (six rats per group, four records per rat). Column not sharing a common superscript are significantly different. Data were log-transformed before statistical analysis. Please refer to Table 1 for abbreviations

Mineral bioavailability

All the rats fed test diets showed significantly higher body weight gains than did group DD (P< 0.0001); no difference in body weight gain was observed between groups 5 and 25 (Figure 1). The addition of calcium, iron and zinc to the supplemented diet (group 25-PS) failed to promote any body weight increase. In fact, the rats fed this diet showed a smaller body weight gain than group 25 (P< 0.0001). The addition of NaCl, KF and KI to the supplemented diet (group 25-AS), however, resulted in a 2-fold increase in body weight in relation to the rats fed diet 25. The diet containing a low phytate concentration (group 25-LPC) also provided a significant increase in weight gain (P< 0.0001) compared to the diet containing a native phytate concentration (group 25). The rats from groups 25-AS and 25-LPC reached, respectively, 50% and 57% of the body weight gain displayed by the reference group (Figure 1).

The rats suffered a partial loss of fur during the malnutrition induction period. All the test diets promoted fur regrowth, although the rats fed with the 5, 25 and 25-PS diets showed a lower regrowth rate than the others, while group DD continued to lose fur until the end of study.

The test groups showed femur calcium contents at least 3 times higher than group DD (Figure 2). The femur calcium concentrations found in groups 25-AS, 25-LPC and 25-PS did not differ significantly from group 25, although the femur weight of the first two groups was higher (Figure 1). The highest femur zinc concentration was found in group 25-PS (P< 0.026). The femur zinc concentration found in groups 25-AS and 25-LPC was not significantly different from group DD and showed the lowest values (Figure 2), while the pancreas zinc concentration found in these two test groups was significantly lower than that of group DD (P< 0.001) (Figure 3).

FIGURE 1

Body weight gain (□) and Femur weight (■) of undernourished rats fed Deficient Diet with or without supplementation, for 28 days. (DD) Deficient Diet; Test diets contained DD supplemented (g/100g): (5) MM 5; (25) MM 25; (25-PS) MM 25, CaCO₃, FeSO₄ and ZnSO₄; (25-AS) MM 25, NaCl, KI and KF; (25-LPC) dephytinized MM 25; (RD) Reference Diet. Columns sharing the same letter are not significantly different (P< 0.012 for weight gain and P< 0.049 for femur weight). Average and standard errors for six rats. Data were log-transformed before statistical analysis.

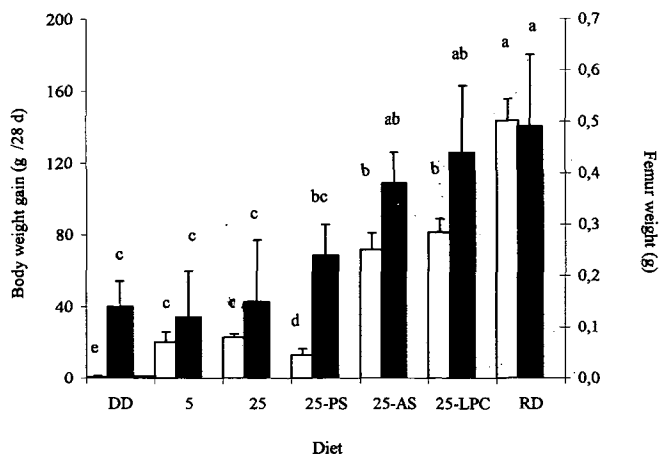


FIGURE 2

Calcium (□) and zinc (■) content in femurs of undernourished rats fed the Deficient Diet with or without supplementation, for 28 days. (DD) Deficient Diet; Test diets contained DD supplemented with (g/100g): (5) MM 5; (25) MM 25; (25-PS) MM 25, CaCO₃, FeSO₄ and ZnSO₄; (25-AS) MM 25, NaCl, KI and KF; (25-LPC) dephytinized MM 25; (RD) Reference Diet. Columns sharing the same letter are not significantly different ($P < 0.026$). Average and standard errors for six rats. Data were log-transformed before statistical analysis.

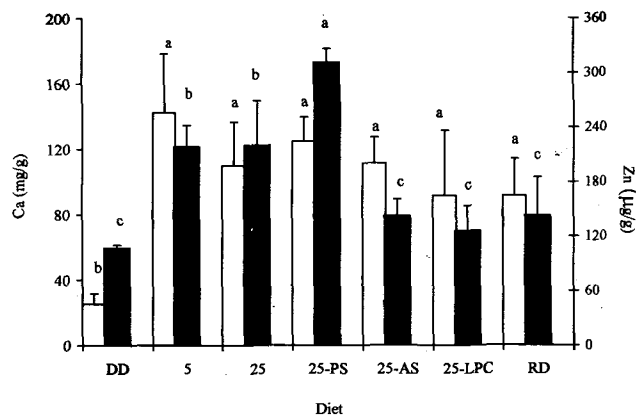
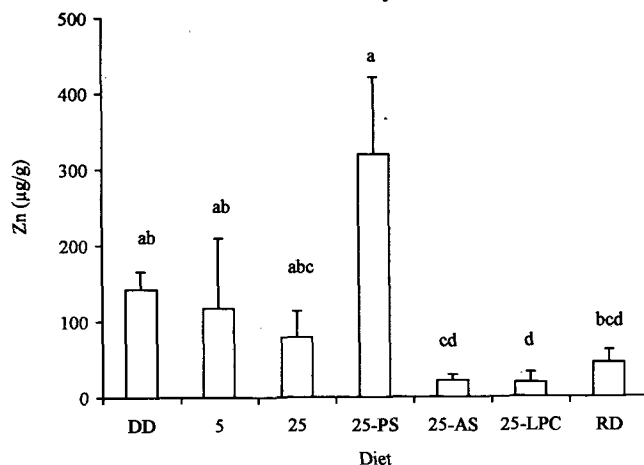


FIGURE 3

Zinc content in pancreas of undernourished rats fed Deficient Diet with or without supplementation for 28 days. (DD) Deficient Diet; Test diets contained DD supplemented (g/100g): (5) MM 5; (25) MM 25; (25-PS) MM 25, CaCO₃, FeSO₄ and ZnSO₄; (25-AS) MM 25, NaCl, KI and KF; (25-LPC) dephytinized MM 25; (RD) Reference Diet. Columns sharing the same letter are not significantly different ($P < 0.029$). Average and standard errors for six rats. Data were log-transformed before statistical analysis.



A comparative analysis of the rats' hemoglobin values showed that, with the exception of group 5, all were anemic in relation to group RD. Although groups 25 and 25-PS were anemic, their hemoglobin concentration was no different from group 5 ($P < 0.028$). All the experimental groups showed hematocrit values lower ($P < 0.026$) than those of the RD group. The hemoglobin and hematocrit values of groups 25-AS and 25-LPC were the lowest.

DISCUSSION

Molar phytate:calcium (PA:Ca), phytate:iron (PA:Fe) and phytate:zinc (PA:Zn) ratios have been considered as bioavailability indicators of these elements in diets. The critical molar ratio, above which ion absorption may be impaired, has been determined by several authors at PA:Ca > 1.56 , PA:Fe > 14 and PA:Zn > 10 (19, 20). More recently, the concept of bioavailability has included not only the element's absorption but also its final effect on the organism (22). Therefore, body weight gains, the regrowth of rat fur, hemoglobin concentrations and the Ca, Fe and Zn content in tissues were also used in this study as indicators of the bioavailability of these cations in MM. The addition of a 5% MM supplement in the mineral, protein and vitamin deficient diet promoted a significant increase in the rats' growth rate and aided fur recovery. However, group 25, which was fed four times more MM than group 5, showed a similar growth rate.

The reduction of PA:Ca, PA:Fe and PA:Zn by the addition of Ca, Fe and Zn (diet 25-PS) did not increase the relative balance of the elements nor did it promote any increase in femur Ca and hemoglobin concentration, in body weight or in fur regrowth in relation to diet 25. These results suggest that the reduction in the PA:Ca, PA:Fe and PA:Zn molar ratios were not a relevant factor in the bioavailability of these three ions in the supplemented diet.

Contrary to our expectations, the use of dephytinized wheat and rice bran in the MM (group 25-LPC), which also reduced the phytate:element molar ratio, increased neither the relative calcium, iron and zinc balances nor the Ca, Fe and Zn tissue contents in comparison to group 25. Moreover, the rats fed the 25-LPC diet showed an even lower hemoglobin count and femur Zn concentrations than did group 25 (Table 4, Figure 2). Our results suggest that the extra weight gain (Figure 1) and the total fur recovery shown by group 25-LPC were not a consequence of an improvement in the element bioavailability but were, in fact, due to the increase in food consumption. Development of anemia was also reported in children during the malnutrition treatment (23), Refino and Dallman (24) found also that rate of iron repair deficiency anemia or blood loss was lower in younger rats. The severe anemia found in the rats with the highest growth rate (groups 25-LPC and 25-AS) may have been caused by the fact that

the iron content in the diet was insufficient to simultaneously maintain iron homeostasis and promote hematopoiesis in the rapidly growing animals. A longer period of treatment with those diets might reverse the anemia in undernourished rats.

TABLE 4

Blood hemoglobin concentration (HGB) and hematocrit values (HCT) of undernourished rats fed DD supplemented with multimixture containing different phytate and mineral concentrations for 28 days *

Diet	HGB (g/L)		HCT l	
	Mean	SE	Mean	SE
DD	149 ^{cd}	4.0	0.45 ^d	0.01
5	163 ^{ab}	5.0	0.50 ^b	0.01
25	152 ^{bc}	3.3	0.47 ^{cd}	0.01
25-PS	159 ^{bc}	4.5	0.48 ^c	0.02
25-AS	132 ^e	6.1	0.42 ^e	0.02
25-LPC	136 ^{de}	6.3	0.42 ^e	0.01
RD†	173 ^a	14	0.63 ^a	0.06
Significance	(P<0.028)		(P<0.026)	

Average and standard errors for n = 6. Column not sharing a common superscript are significantly different.

† Normal values were considered those obtained for Wistar rats weaned at 21 d and fed the reference diet during 28 d.

Please refer to Table 1 for abbreviations.

Investigations of dephytinized diets in humans and rats have shown an increase in iron bioavailability, which has been attributed to the reduction of phytate concentration (19,25,26). However, a more recent study concluded that wholewheat flour, rich in phytic acid and minerals, caused no negative effect on mineral absorption but, on the contrary, improved the bioavailability of some minerals in rats (27). Most phytate reduction methods have employed either acid-salt washing or enzymatic hydrolysis processes. In the former, the protein conformations must be considered since the ion-binding sites in proteins may be irreversibly destroyed during the acid-salt washing process, possibly rendering the minerals more available for absorption. Hurrell et al. (25) working with low phytate soy protein isolates, concluded that, even after the removal of virtually all phytate, soy protein itself is still inhibitory to iron absorption.

Several endogenous enzymes may be activated during the hydrolytic action of phytase, resulting in the hydrolysis of several nutrients such as polysaccharides or even proteins and releasing products that are more easily absorbed by the body. The effect of complex carbohydrate fermentation on the bioavailability of trace elements has been reported by other authors (28). Our results showed that the concentration

of reducing sugars in diet 25-LPC was 28.0 ± 3.4 g/100g, while diet 25 showed 18.9 ± 1.24 g/100g. These data support the above hypothesis and may also explain the increase of food consumption of the 25 LPC diet by the rats, which was responsible for their increased growth rate.

Diets 5 and 25-LPC contained similar phytate concentrations (Table 1); however, the former group showed a higher relative phytate balance (Table 3). A possible explanation for the unusually high phytate balance found in group 5 may be the adaptive mechanism described by Moore and Veum (29), according to which the digestibility of phytate increases in phosphorus-deprived rats. Although this induction mechanism has yet to be characterized, an increase in bacterial alkaline phosphatase activity and an induced extracellular fungal phytase have been observed in microbial fermentation under limited inorganic phosphorus (8). Therefore, as the phosphorus content in diet 5 was lower than that in diet 25-LPC (Table 1), we suggest that the phosphatase in the rats' microflora was induced, resulting in enhanced phytate hydrolysis.

Mineral salts, which are present in MM in low concentrations, were added to the 25 diet to verify the possible effects of some essential anions on the bioavailability of calcium, iron and zinc. Although the addition of KI, KF and NaCl salts (group 25-AS) increased the rats' growth rate (Figure 1), the relative balance of calcium, iron and zinc (Table 2) and the concentration of Ca and Zn in the tissues (Figures 2 and 3) were no higher than in the rats that received diet 25. These results suggest that MM was deficient in KI, KF and NaCl and that these minerals did not affect the bioavailability of Ca, Fe and Zn in diet 25-AS.

The low zinc concentrations in the pancreas (Figure 3) of the rats with the largest weight gain (groups 25-AS and 25-LPC) is apparently correlated with growth rates and zinc requirements. Zinc requirements for undernourished rats with high growth rates should be higher than the RNN, both for recovery of the normal zinc levels in the body and to supply the zinc requirements for growth. Because the pancreas is responsible for homeostasis of the body's zinc (30,31), dietary zinc during growth would not accumulate in the pancreas but instead, would be distributed to priority tissues involved in the rats' growth. On the other hand, the distribution role of the pancreas in rats showing moderate growth (groups 5, 25 and 25-PS) would be diminished and hence, surplus dietary zinc might be stored in the femur (Figure 2).

To conclude, the addition of up to 25% MM to a deficient diet aided the recovery of undernourished rats, although the lack of some mineral salts restricted the potential of MM as a complete dietary supplement. Reduction of molar PA:(Ca, Fe or Zn) ratios by the addition of these ions did not increase the Ca, Fe and Zn bioavailability of the MM. The dephytinization process and the addition of KI, KF and NaCl

to the supplemented diet increased its food consumption, thus being responsible for the rats' incremental growth. However, the above procedures increased neither the relative balance of Ca, Fe and Zn in undernourished rats nor these ion concentrations in the target tissues. Our findings suggest that the bran phytate content does not impair Ca, Fe and Zn bioavailability in deficient diets supplemented with up to 25% of MM. Considering that phytase activity in rats is higher than in humans (32) and that this fact may have influenced our results, it is recommended that studies be carried out on human subjects before feeding MM to undernourished children.

ACKNOWLEDGEMENT

Carlos Gonçalves is thanked for his statistical analysis assistance.

REFERENCES

1. Monteiro CA, Benicio MHD'A, Iunes R, Gouveia NC, Taddei JAAC & Cardoso MAA Nutritional status of Brazilian children: trends from 1975 to 1989. *Bulletin of the World Health Organization* 1992; 70: 657-666.
2. Brandão CT. Alimentação Alternativa Relatório Técnico, Ministério da Saúde. Brasília, Brazil 1996;1-95.
3. Farfan JA. Alternative foods: a critical analysis of a proposal for nutritional intervention. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Brazil 1998;14: 205-212.
4. Ministério da Saúde Suplementação alimentar com alimentos não convencionais. Relatório Técnico, Brasília DF, Brazil 1992.5. Ministério da Saúde Alimentação alternativa. Relatório técnico, Brasília DF, Brazil 1994; pp 2-11.
6. Richard SE & Thompson LV Interactions and biological effects of phytic acid. Workshop report. ACS Symposium Series 1997; 294-312.
7. Sandenberg AS, Andersson H, Carlsson NG & Sandstrom B. Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. *J Nutr* 1987; 117: 2061-2065.
8. Dvoráková J. Phytase: sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiologica* 1998; 43:323-338.
9. Reeves PG, Nielsen FH & Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *Ad Hoc* Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76^A rodent diet. *J Nutr* 1993;123: 1939-1951.
10. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC. 14th Ed. Washington DC, The Association, 1990.
11. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC.. 16th Ed. Washington DC, The Association, 1996;
12. Jorhem L. Determination of metals in foodstuffs by atomic absorption spectrophotometry after dry ashing: NMKL interlaboratory study of lead, cadmium, zinc, copper, iron, chromium, and nickel. *J Assoc Off Analyt Chem* 1993; 76: 798-811.
13. Hartiti S, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Lisbona F, Pallares I, Alferéz MJM, Gomez-Ayala AE & Campos MS. Zinc metabolism in rats: effects of intestinal resection, cholecalciferol and ascorbic acid. *Nutr Res*. 1994; 14: 1523-1534.
14. Franz RB, Kennedy BM & Fellers DA. Relative bioavailability of zinc using weight gain of rats. *J Nutr* 1980; 10: 2263-2271.
15. Latta M & Eskin M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agr Food Chem* 1980; 28: 1313-1315.
16. Breuil C & Saddler JN. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enz Microbiol Techn* 1985; 7: 327-332.
17. Berk KN & Carey P. Data analysis with Microsoft Excel. Brooks/Cole Publishing Company. 1998; 8: 235
18. Madruga, M.S. & Camara, F.S. (2000) The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. *Food Chem*. 68: 41-44.
19. Saha PR, Weaver CM & Mason AC Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *J Agr Food Chem* 1994; 42: 2531-2535.
20. Ellis R, Kelsay JL, Reynolds RD, Morris ER, Moser PB & Frazier CW. Phytate: zinc and phytate x calcium: zinc millimolar ratios in self-selected diets of Americans, Asian Indians, and Nepalese. *J Am Dietet Assoc* 1987; 87: 1043-1047.
21. Lopez HW, Coudray C, Bellanger J, Younes H, Demigné C & Rémésy C. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J Nutr* 1998; 128: 1192-1198.
22. Cozzolino SMF. Mineral bioavailability. *Revista de Nutrição da Puccamp*, Campinas SP, Brazil 1997; 10: 87-98.
23. Macdougall LG, Moodley G, Eyberg C & Quirk M. Mechanism of anemia in protein-energy malnutrition in Johannesburg. *Am J Clin Nutr* 1982; 35:229-235.
24. Refino CJ & Dallman PR. Rate of repair of iron deficiency anemia and blood loss anemia in young and mature rats. *Am J Clin Nutr* 1983; 37: 904-909.
25. Davidsson L, Galan P, Kastenmayer P, Cherouvrier F, Juillerat M-A, 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; 36: 816-822.
26. Hurrell RF, Juillerat M-A, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko AS & Cook JD. Soy protein, phytate and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 573-578.
27. Levrat-Verny M-A, Coudray C, Bellanger J, Lopez HW, Demigné C, Rayssinguier Y & Rémésy C. Whole-wheat flour ensures higher mineral absorption and bioavailability than white wheat flour in rats. *Br J Nutr* 1999, 82, 17-21.
28. Nävert B & Sandström B Reduction of the phytate content of bran by leavening in bread and its effect on zinc absorption in man. *Br J Nutr* 1985; 53: 47-53.

29. Moore RJ & Veum TL. Adaptive increase in phytate digestibility by phosphorus-deprived rats and the relationship of intestinal phytase (EC 3.1.3.8) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) to phytate utilization. *Br J Nutr* 1983; 49: 145-152
30. King JC. Assessment of zinc status. *J Nutr* 1990; 120: 1474-1479.
31. Oberleas D. Mechanism of zinc homeostasis. *J Inorg Biochem* 1996; 62: 231-241.
32. Iqbal TH, Lewis KO & Cooper BT. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut* 1994; 35:1233-1236.

Recibido:14-09-2000

Aceptado: 10-07-2001

Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina

Rosimar R. da Silva, Tânia T. de Oliveira, Tanus Jorge Nagem, Aloísio da Silva Pinto,
Luiz F. Teixeira Albino, Márcia Rogéria de Almeida, George H. K. de Moraes, José Geraldo Pinto

Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Brazil

RESUMO. Flavonóides são pigmentos fenólicos de plantas que possuem várias atividades biológicas, sendo que muitas destas estão associados com prevenção de doenças crônicas como câncer e hiperlipidemia. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos flavonóides naringina e rutina sobre o metabolismo lipídico de aves hipercolesterolêmicas. De acordo com os resultados pode-se observar que naringina e rutina reduziram significativamente as concentrações de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triacilgliceróis totais, não apresentando, entretanto, reduções nos níveis de colesterol-HDL.

Palavras chave: Naringina, rutina, colesterol, pintos.

SUMMARY. Hypocholesterolemic effect of flavonoids naringin and rutin. Flavonoids are pigments fenolics of plants that possess several biological activities, and many of these are associated with prevention of chronic diseases as cancer and hyperlipidemy. This work had as objective evaluates the effect of the flavonoids naringin and rutin on the metabolism lipidic of chicks hypercholesterolemic. In agreement with the results it can be observed that naringin and rutin reduced the levels of total cholesterol significantly, cholesterol-LDL, cholesterol-VLDL and triglycerols, not presenting, however, reductions in the levels of cholesterol-HDL.

Key words: Naringin, rutin, cholesterol, chicks.

INTRODUÇÃO

Os flavonóides são compostos polifenólicos, encontrados somente em plantas. Estes compostos são absorvidos no trato gastrointestinal de homens e animais e são excretados intactos ou como metabólitos na urina e fezes (1).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonóides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação plaquetária, e de ativar sistemas enzimáticos incluindo ciclooxygenases e lipoxigenases (1). Esses efeitos são devidos a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (1). Outros estudos também têm mostrado que os flavonóides quercetina, rutina e naringina inibem a biossíntese de eicosanóides (resposta antiprostanóide e antiinflamatória) (2), protegem a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (previnem formação de placa aterosclerótica), previnem agregação plaquetária (efeitos antitrombóticos), e promovem relaxamento de músculo liso (efeito antihipertensivo e antiarrítmico). Além disso, flavonóides têm também apresentado propriedades antivirais e carcinostáticas (2). A atividade dos flavonóides atuando como inibidores da enzima transcriptase reversa sugere um lugar desses compostos no controle de infecções por retrovírus, como na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (2).

Experimentos realizados em ratos mostraram que flavonóides extraídos de beringela (*Solanum melongena*) apresentaram efeito na redução nos níveis sanguíneos de

colesterol total e triacilgliceróis (3). Este efeito pode ser explicado, em parte, pelo aumento da atividade da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), enzima presente na superfície das lipoproteínas de alta densidade (HDL), que converte o colesterol presente em quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), LDL e tecidos periféricos em ésteres de colesterol, transportando-os para o fígado para serem metabolizados, reduzindo assim os níveis de colesterol sanguíneo; e pelo aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica, que remove os ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes em quilomícrons e VLDL para o tecido adiposo, resultando numa redução dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis. Observou-se também neste experimento um aumento nos níveis de ácidos biliares hepáticos e fecais, bem como esteróis neutros fecais, indicando uma alta taxa de degradação de colesterol e redução na reabsorção intestinal de ácidos biliares (3).

Pereira (4) avaliou o efeito dos flavonóides kaempferol, biochanina A, naringina, isoliquiritigenina, genisteína, baicaleína e dos corantes naturais monascus, antocianina, carmin e clorofila sobre os níveis de lipídeos sanguíneos em ratos. Os resultados mostraram que todos os compostos testados apresentaram efeito na redução dos níveis de colesterol total e triacilgliceróis sanguíneos não reduzindo, entretanto, os níveis de colesterol-HDL. Isto é importante, uma vez que o colesterol-HDL é responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde é metabolizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do ensaio biológico foram utilizados aves da linhagem *Avian farms*, machos, com 7 dias de idade, provenientes do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com peso médio de 150g, que receberam ração (Tabela 1) e água *ad libitum* durante 21 dias. Este experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, em seis repetições: **GRUPO 1 (G1)**: Ração Basal (Grupo padrão), **GRUPO 2 (G2)**: Ração Basal + 10% de Gordura suína + 0,7% de Colesterol + 0,1% de ácido cólico (Grupo controle), **GRUPO 3 (G3)**: Ração Basal + 10% de Gordura de suíno + 0,7% de Colesterol + 0,1% de ácido cólico + 20mg de Naringina, **GRUPO 4 (G4)**: Ração Basal + 10% de Gordura de suíno + 0,7% de Colesterol + 0,1% de ácido cólico + 20mg de Rutina. Os flavonóides naringina e rutina foram administrados via oral, misturados à ração, diariamente. O peso dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

TABELA 1
Composição das rações experimentais

Ingredientes	Ração Basal (RB)	RB + 0,7% Colesterol +0,1% Ácido Cólico
Milho	53,635	45,900
Farelo de soja	38,860	38,860
Gordura suína	-	10,000
Óleo vegetal	3,100	-
Colesterol	-	0,700
Ácido cólico	-	0,100
Fosfato bicálcico	2,638	2,640
Calcário calcítico	0,836	0,840
Cloreto de sódio	0,387	0,390
Vitaminas	0,100	0,100
DL-metionina	0,235	0,235
Minerais	0,050	0,050
Anticoccidiano	0,060	0,050
Promotor de crescimento (1)	0,050	0,075
Cloreto de colina	0,060	0,060

1. Virginiamicina 2%

As amostras de sangue destas aves foram coletadas por punção cardíaca no 1^o, 7^o, 14^o e 21^o dias de experimento, após jejum de 12 horas, para posterior dosagens sorológicas de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL, colesterol-VLDL e triacilglicerol. As amostras foram centrifugadas a 7100 x G, durante 15 minutos, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas em equipamento Alizé (Analisador automático de bioquímica), utilizando-se kits da marca Biomérieux e os resultados foram

expressos em mg/dL.

A análise colorimétrica do colesterol total no soro obtido, baseia-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácidos graxos, mediado pela enzima colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pela enzima colesterol oxidase em colest-4-eno-3-ona, liberando água oxigenada. A água oxigenada formada, juntamente com o fenol e amino 4 antipirina, pela ação da peroxidase, são transformados no cromogênio (que absorve em 500 nm) e em água.

O método de dosagem de colesterol-HDL baseia-se na precipitação dos quilomícrons e das VLDL e de LDL contidos no soro a ser analisado, pela adição do ácido fosfotúngstico em presença do íon magnésio. O sobrenadante obtido por centrifugação contém as HDL, e o colesterol presente nesta lipoproteína foi determinado pelo mesmo processo já descrito na dosagem de colesterol total.

As diversas classes de lipoproteínas se diferenciam pela sua densidade, migração eletroforética e sua reação frente a anticorpos específicos. O método de dosagem de colesterol-LDL baseia-se na precipitação LDL contidos no soro a ser analisado, pela adição do reativo precipitante (surfactante policíclico policondensado, surfactante aniônico policíclico, dioxano polisubstituído e tampão imidazol pH 6.1). O precipitado contendo LDL é então solubilizado. O colesterol presente nesta lipoproteína foi determinado pelo mesmo processo já descrito na dosagem de colesterol total.

Para quantificação do VLDL dividiu-se o valor de triacilgliceróis por 5.

A dosagem do triacilglicerol sérico foi feita por via inteiramente enzimática. A lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. O glicerol obtido, reage com ATP, em presença da enzima glicerolquinase, obtendo glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3-fosfato é oxidado a dihidroxiacetona-fosfato, pela ação da enzima glicerol-3-fosfatato oxidase, liberando água oxigenada. A água oxigenada, juntamente com paraclorofenol e amino 4 antipirina, em presença da peroxidase, transforma-se no cromogênio (que absorve em 505 nm), liberando água.

Este experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado. As médias do grupo controle (G2) foi comparada entre si pela análise de variância e teste F ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) e os demais grupos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A comparação de cada grupo tratado com o controle foi feita por meio do teste de Dunnett ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, para colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triacilgliceróis obtidos do soro sanguíneo dos animais, com hiperlipidemia

induzida por colesterol, ácido cólico e gordura suína, encontram-se nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, expressos em mg/dL, com suas respectivas porcentagens de variações.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que todas as substâncias testadas apresentaram reduções significativas nos níveis sanguíneos de colesterol total, quando comparados com o grupo 2

(controle). No entanto, deve-se destacar que os animais do grupo 3 (naringina) apresentaram os melhores resultados na redução dos níveis de colesterol total, apresentando redução de 32,17%, no final do período experimental. Estes resultados demonstram que os flavonóides testados apresentam efeito hipocolesterolêmico em aves alimentadas com dieta suplementada com colesterol, ácido cólico e banha de suíno.

TABELA 2
Colesterol total médio, em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e controle (G2), em %, de aves submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade

Idade (dias)	Tratamento	Colesterol total (mg/dL)	Variação (%) em relação a:	
			G1	G2
7	-	145,50 ± 20,55	-	-
14	G1 – Ração Basal (RB)	143,83 ± 17,94B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	232,67 ± 52,33 A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	175,83 ± 28,72 a	+22,25	-24,43 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	215,17 ± 46,17 a	+49,60 *	-7,52
21	G1 – Ração Basal (RB)	131,17 ± 17,87B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	291,33 ± 32,21A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	215,17 ± 3,97 ^a	+64,04 *	-26,14 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	171,50 ± 48,24b	+30,75	-41,13 *
28	G1 – Ração Basal (RB)	141,67 ± 10,68B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	338,83 ± 64,15A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	229,83 ± 15,60a	+62,23 *	-32,17 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	241,17 ± 28,05a	+70,23 *	-28,82 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

GS= Gordura suína, C= Colesterol, AC= Ácido Cólico, NA= Naringina, R= Rutina.

Vários estudos sobre o efeito de flavonóides nos níveis sanguíneos de colesterol total foram realizados. Santos et al. (5) verificaram efeito hipolipidêmico dos flavonóides morina e quercetina isoladamente e associados ao ácido nicotínico em ratos. Nagem et al (6), também verificaram efeito hipolipidêmico bastante acentuado do flavonóide naringina isoladamente e associados aos corantes naturais antocianina e carmin em ratos. Itaya e Igarashi (7) também relataram atividade hipolipidêmica dos flavonóides taxifolina, rutina e catequina.

Estudos realizados por Santos et al (8) também relatam o efeito dos flavonóides naringenina, rutina e ácido nicotínico isoladamente e associados na redução dos lipídeos sanguíneos. Também Santos et al. (9) relatam ações hipolipidêmicas dos flavonóides naringenina, rutina e dos corantes naturais monascus e antocianina isoladamente e

associados. Para que no futuro estas substâncias possam ser utilizadas como medicamentos torna-se necessário o seu estudo farmacológico e toxicológico em diferentes espécies de animais.

A regulação dos níveis de colesterol plasmático envolve fatores que influenciam o metabolismo intracelular e extracelular do colesterol. As duas enzimas chaves envolvidas são a hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase e a acil CoA colesterol-O-aciltransferase. Os inibidores da enzima HMG-CoA redutase são muito efetivos em reduzir o colesterol plasmático em muitas espécies animais, incluindo humanos (10).

Estudos sobre mecanismo de ação têm mostrado que os flavonóides naringina e hesperidina reduzem os níveis de colesterol hepático e plasmático através da inibição da enzima HMG-CoA redutase, enzima chave na síntese de colesterol,

e acil CoA: colesterol transferase, enzima que esterifica o colesterol livre utilizando ácido graxo. O colesterol esterificado é armazenado na célula como gotículas ou, no caso do fígado, é incorporado às VLDL e “exportado” para o plasma (10,11).

A inibição da enzima HMG-CoA redutase leva a um aumento no número de receptores hepáticos para LDL, e consequentemente, diminui o nível plasmático de colesterol-LDL (11).

Os valores médios da concentração sanguínea de colesterol-HDL, mostrado na Tabela 3, indicam que os tratamentos não apresentaram variações significativas,

estatisticamente, quando comparados com o grupo 2 (controle). Esses resultados são favoráveis, pois a manutenção ou a tendência de elevação do colesterol-HDL, em animais que se encontram com os níveis de colesterol aumentados, resulta num benefício, pois o colesterol-HDL é o responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado onde é metabolizado. Além disso, estudos demonstraram o papel protetor das HDL na função endotelial. Justifica-se assim a utilização de medidas e fármacos para elevar os níveis de HDL, com a finalidade de preservar a função endotelial e prevenir a aterogênese (12).

TABELA 3
Colesterol-HDL médio, em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e controle (G2), em %, de aves submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade

Idade (dias)	Tratamento	Colesterol total (mg/dL)	Variação (%) em relação a:	
			G1	G2
7	-	64,50 ± 12,07	-	-
14	G1 – Ração Basal (RB)	102,67 ± 18,76 A	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	105,17 ± 22,30 A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	120,33 ± 20,33 a	+17,20	+14,41
	G4 – RB+GS+C+AC+R	103,33 ± 22,33 a	+0,64	-1,75
21	G1 – Ração Basal (RB)	87,00 ± 21,56A	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	101,67 ± 4,59A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	114,00 ± 25,25a	+31,03 *	+12,13
	G4 – RB+GS+C+AC+R	105,17 ± 14,99a	+20,89	+3,44
28	G1 – Ração Basal (RB)	102,17 ± 15,10A	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	84,33 ± 11,43B	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	103,83 ± 9,17a	+1,62	+23,12
	G4 – RB+GS+C+AC+R	82,67 ± 9,35b	-19,09	-1,97

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ($P<0,05$).

* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ($P<0,05$), em cada tempo.

GS= Gordura suína, C= Colesterol, AC= Ácido cólico, NA= Naringina, R= Rutina.

Alguns pesquisadores têm observado que pintos alimentados com colesterol apresentam altos níveis de colesterol-HDL. Isto pode ser devido ao elevado transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde ocorre catabolismo e excreção do colesterol. Estudos também têm mostrado que em pintos recém-eclodidos, o depósito de colesterol no músculo esquelético estimula a síntese de apoproteína A-I, que é a apoproteína característica da HDL. Esta apoproteína ativa a enzima LCAT, que esterifica o colesterol presente na superfície da HDL, que converte o colesterol presente em quilomícrons, VLDL, LDL e tecidos

periféricos em ésteres de colesterol, para serem transportados para o fígado. Quando pintos recém-eclodidos são alimentados com dieta aterogênica, a síntese de apoproteína A-1 e HDL pode ser mantida por mais tempo do que quando comparados com animais alimentados com dietas normais. O aumento de HDL pode ser causado pelo acúmulo de colesterol nos tecidos (13).

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4, pode-se observar que os animais que receberam os flavonóides naringina e rutina apresentaram reduções significativas nos níveis de colesterol-LDL, sendo que os animais que

receberam naringina apresentaram reduções de 51,83% na primeira semana, 25,29% na segunda semana e 49,85% na terceira semana de tratamento. Já os animais que receberam

rutina apresentaram reduções de 45,74% na segunda semana e 28,32% na terceira semana de tratamento quando comparados com o grupo controle (G2).

TABELA 4
Colesterol-LDL médio, em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e controle (G2), em %, de aves submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade.

Idade (dias)	Tratamento	Colesterol total (mg/dL)	Variação (%) em relação a:	
			G1	G2
7	-	29,50 ± 8,48	-	-
14	G1 – Ração Basal (RB)	21,17 ± 4,88B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	113,83 ± 52,01A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	54,83 ± 19,35b	+159,00	-51,83 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	105,33 ± 20,00a	+397,54 *	-7,47
21	G1 – Ração Basal (RB)	24,00 ± 2,61B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	145,00 ± 32,41A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	108,33 ± 38,77a	+351,38 *	-25,29
	G4 – RB+GS+C+AC+R	78,67 ± 47,43a	+227,75 *	-45,74 *
28	G1 – Ração Basal (RB)	26,83 ± 5,74B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	213,00 ± 67,90A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	106,83 ± 18,88b	+293,19 *	-49,85 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	152,67 ± 19,93a	+461,91 *	-28,32 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ($P < 0,05$).

Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$), em cada tempo.

GS= Gordura suína, C= Colesterol, AC= Ácido cólico, NA= Naringina, R= Rutina.

O fator mais importante no processo de desenvolvimento da aterosclerose consiste na presença de altas concentrações plasmáticas de colesterol na forma de LDL, portanto, redução dos níveis plasmáticos do colesterol destas lipoproteínas auxilia na prevenção da doença aterosclerótica coronária.

Vários estudos têm demonstrado que flavonóides reduzem os níveis plasmáticos de colesterol-LDL. Kirk et al. (14) avaliaram o efeito dos flavonóides genisteína e daidzeína em camundongos, com e sem receptores de LDL. Neste estudo observou-se que, nos animais com receptores de LDL os flavonóides testados aumentaram a atividade dos receptores. A LDL transporta o colesterol para os tecidos periféricos, e os flavonóides ao ativarem os receptores de LDL no hepatócito, aumentam a endocitose o que leva à redução dos níveis sanguíneos de colesterol.

Pelas Tabelas 5 e 6, pode-se observar que todas as substâncias testadas foram efetivas em reduzir os níveis de colesterol VLDL e triacilgliceróis, quando comparadas com

o grupo controle (G2), ao longo de todo o período experimental.

Estudos epidemiológicos sugerem que o aumento do conteúdo de colesterol dos quilomícrons e remanescentes de quilomícrons, que ocorre depois da ingestão de alimentos ricos em colesterol, leva à formação de partículas que são similares em tamanho aos remanescentes de VLDL, e parecem também ser aterogênicas. Outro mecanismo seria, no nível da parede arterial, a liberação de colesterol na hidrólise dos quilomícrons pela lipase lipoprotéica. Excesso de colesterol hepático forma partículas de VLDL muito ricas em colesterol, e desse modo com aumento de sua aterogenicidade. Partículas de HDL, enriquecidas com colesterol, têm seu papel no transporte reverso prejudicado (transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado) (15).

TABELA 5

Colesterol-VLDL médio, em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo padrão (G1) e controle (G2), em %, de aves submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade

Idade (dias)	Tratamento	Colesterol total (mg/dL)	Variação (%) em relação a:	
			G1	G2
7	-	7,57 ± 0,96	-	-
14	G1 – Ração Basal (RB)	6,57 ± 0,63B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	32,17 ± 4,69A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	7,45 ± 1,01a	+13,70	-76,78 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	6,93 ± 1,35a	+5,48	-78,46 *
21	G1 – Ração Basal (RB)	5,80 ± 0,89B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	48,53 ± 9,26A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	4,37 ± 0,59a	-24,66	-91,00 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	5,40 ± 0,49a	-6,90	-88,87 *
28	G1 – Ração Basal (RB)	4,93 ± 1,30B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	48,90 ± 7,95A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	4,80 ± 0,40a	-2,64	-90,18 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	4,97 ± 0,34a	+0,81	-89,84 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

GS= Gordura suína, C= Colesterol, AC= Ácido cólico, NA= Naringina, R= Rutina.

TABELA 6

Triacilglicerol médio, em mg/dL e percentual de variação em relação aos grupos controle (G1 e G2), em %, de aves submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade

Idade (dias)	Tratamento	Colesterol total (mg/dL)	Variação (%) em relação a:	
			G1	G2
7	-	37,83 ± 4,79	-	-
14	G1 – Ração Basal (RB)	32,83 ± 3,18B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	160,83 ± 23,48A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	37,33 ± 5,08a	+13,71	-76,79 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	34,67 ± 6,77a	+5,60	-78,44 *
21	G1 – Ração Basal (RB)	29,00 ± 4,42B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	240,17 ± 49,39A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	21,83 ± 2,92a	-24,72	-90,91 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	27,00 ± 2,44a	-6,90	-88,76 *
28	G1 – Ração Basal (RB)	24,67 ± 6,53B	-	-
	G2 – RB + GS+C+AC	244,50 ± 39,78A	-	-
	G3 – RB+GS+C+AC+NA	24,00 ± 2,00a	-2,72	-90,18 *
	G4 – RB+GS+C+AC+R	24,83 ± 1,72a	+0,65	-89,84 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

GS= Gordura suína, C= Colesterol, AC= Ácido cólico, NA= Naringina, R= Rutina.

O efeito hipolipidêmico dos flavonóides sobre os níveis de triacilgliceróis podem ser explicados, em parte, pelo aumento da atividade da enzima lipase, provocadas pelos flavonóides. Gomes (16) relata os efeitos dos flavonóides morina, naringina, naringenina e rutina sobre o aumento da atividade da enzima lipase. Esta enzima é responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis, portanto, um aumento na atividade desta enzima promoverá maior mobilização dos ácidos graxos dos triacilgliceróis sanguíneos para o fígado, tecido muscular e tecido adiposo.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, pode-se concluir que os flavonóides naringina e rutina apresentaram reduções significativas nas concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triacilgliceróis. Com relação à concentração plasmática de colesterol-HDL, observa-se que houve um aumento significativo para o grupo de animais que receberam naringina (G3) no final do período experimental (23,12%) não havendo, entretanto, variação significativa para os animais que receberam rutina (G4). Esses resultados são favoráveis, uma vez que, o colesterol-HDL é o responsável pelo transporte do excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde é metabolizado. Com isso, pode-se sugerir o uso destas substâncias no controle do metabolismo lipídico de humanos com hiperlipidemia. Entretanto o estudo em outras espécies animais bem como o estudo do efeito toxicológico torna-se necessário para que estas substâncias possam ser utilizadas como medicamento.

REFERÊNCIAS

1. Cook NC, Samman S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, v.7, n.1, 1996;66-76.
2. Pelzer LE, Guardia T, Juarez OA, Guerreiro E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *IL Farmaco*, v. 53, 1998;421-4.
3. Sudheesh S, Presannakumar G, Vijayakumar S & Vijayalakshmi NR. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melogena*. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 51, 1997;321-330.
4. Pereira WL. Efeito hipolipidêmico de flavonóides, corantes naturais e suas associações. Viçosa, MG: UFV, 1999. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
5. Santos KFR, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MGA, Soares JF. Efeitos das associações de morina-ácido nicotínico e quercetina-ácido nicotínico no controle de lipídeos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 31, n. 1, p. 5-7, 1999a.
6. Nagem TJ, Pereira WL, Oliveira TT, Pinto AS, Oliveira MGA, Stringheta PC. Efeitos de naringina e corantes naturais antocianina e carmim no metabolismo lipídico. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 80, n. 1, p. 25-28, 1999.
7. Itaya S, Igarashi K. Effects of taxifolin on the serum cholesterol level in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 56, n. 9, p. 1492-1494, 1992.
8. Santos KFR, Oliveira TT, Nagem T.J, Pinto AS, Oliveira MGA. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacological Research*, v. 40, n. 6, p. 41-46, 1999b.
9. Santos KFR, Oliveira TT, Nagem T.J, Pinto AS, Stringheta, P.C. Associations of flavonoids and natural dyes in the control of lipidic metabolism. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 18, n. 2, p. 127-30, 1999c.
10. Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS e Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *Journal of Nutrition*, v. 129, 1999;1182-1185.
11. Quintão ECR. Colesterol e Aterosclerose. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992;276 p.
12. Batlouni M, Ramires JAF. Importância do endotélio na doença arterial coronariana e na aterogênese. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.62, n. 4, p 255-270, 1994.
13. Jiang Z, Cherian G, Robinson FE, Sim JS. Effect of feeding cholesterol to laying hens and chicks on cholesterol metabolism in pre- and posthatch chicks. *Poultry Science*, v. 69, p.1694-1701, 1990.
14. Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, Leboeuf RC. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor deficient mice. *Journal of Nutrition*, v. 128, p. 954-64, 1998
15. Leite PF. Risco Cardiovascular. Fatores Metabólicos e Nutricionais: Diagnóstico e Tratamento. São Paulo: Loyola, 1994. 175 p.
16. Gomes SM. Efeitos de flavonóides no metabolismo lipídico. Viçosa-MG, UFV, 1998. 95 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Recibido: 14-09-2000

Aceptado: 23-04-2001

Maillard's reaction in parenteral solutions supplemented with arginine

M. R. C. G. Novaes, L. A. M. Lima, M. V. Sousa

University of Brasilia, Brazil

SUMMARY. Arginine, as a basic amino acid, can alter the pH of a parenteral solution and consequently to interfere in the stability of other amino acids. The objective of this study was to analyze the chemical stability of amino acids in solutions for parenteral nutrition with arginine supplementation. Amino acids concentrations were determined using an amino acid analyzer in intervals of 12, 36, 72 hours, 7 and 28 days. Storage temperatures were -20°C , 5°C and 25°C . A decrease was observed ($p < 0.05$) in the concentrations of threonine, methionine, isoleucine, leucine, proline and lysine on the 28th day of study, in the solutions kept at 25°C . The side chains of threonine, methionine, isoleucine, leucine, proline and lysine have hydrophobic groups, which renders them less soluble in water when compared to amino acids that have polar side chains. The degradation of lysine was significant in the sample of parenteral nutrition supplemented with arginine, possibly due to the fact that the solution's pH was between 7.5 and 7.6, therefore facilitating the Maillard reaction between lysine and glucose.

Key words: Parenteral nutrition, amino acids stability, arginine.

RESUMO. Reação de Maillard em soluções parenteral suplementadas com arginina. A arginina sendo um aminoácido básico, pode alterar o pH da solução de nutrição parenteral e conseqüentemente pode influenciar na estabilidade de outros aminoácidos. O objetivo deste estudo foi verificar a estabilidade química dos aminoácidos em soluções de nutrição parenteral com suplementação de arginina. As concentrações dos aminoácidos foram determinadas no analisador de aminoácidos em intervalos de 12, 36, 72 horas, 7 e 28 dias. As temperaturas de estocagem foram -20°C , 5°C e 25°C . Foi observado um decréscimo ($p < 0.05$) nas concentrações de treonina, metionina, isoleucina, leucina, prolina e lisina no 28 dia de estudo, nas soluções estocadas a 25°C . As cadeias laterais de treonina, metionina, isoleucina, leucina, prolina e lisina tem grupos hidrofóbicos o que torna estes aminoácidos menos solúveis em água quando comparados aos aminoácidos que tem cadeias laterais polares, diminuindo o Ph e a concentração dos aminoácidos na solução, estando mais disponíveis para reagir com a cetona do aldeído da glicose. A degradação de lisina foi significativa nas amostras de nutrição parenteral suplementadas com arginina, possivelmente devido ao pH da solução estar entre 7.5 e 7.6, facilitando a reação de Maillard entre a lisina e a glicose.

Palavras chave: Nutrição parenteral, aminoácidos, estabilidade, arginina.

INTRODUCTION

Arginine is commonly known as a metabolic precursor for creatine, polyamines, nitric oxide and proteins. It also has an important role in the urea cycle. More specifically, arginine shows immune and anabolic effects (1), among which are the stimulation of the hypophyseal growth hormone, the stimulation of anti-tumor actions and the increase of killer and T-helper cells activities (2,3). The supplementation of arginine in parenteral nutrition solutions has been suggested for patients with cancer, because it seems to decrease the frequency of septic complications and the mortality rates in postoperative period (4,5).

The appropriate period and temperature of storage of parenteral nutrition solutions, specially when supplemented with additional amounts of arginine, are controversial. Being a basic amino acid, arginine may alter the solution's pH and thus influence the chemical stability of other amino acids present in parenteral solutions. The unstability of solutions

supplemented with arginine could bring direct consequences in the establishment of the validity periods of such solutions.

This study was accomplished with the objective of evaluating the chemical stability of the amino acids threonine, glycine, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine, proline and arginine itself in parenteral nutrition solutions supplemented with extra arginine. Storage temperature, pH, presence and absence of light, color of solutions and growth of microorganisms were studied. Influence of other components used in parenteral nutrition formulations on amino acid concentrations were also monitored as control of factors that could interfere in the quantitative analysis of the amino acids.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of solutions

Forty eight flasks were divided into six groups of solutions designated by the letters A through F (Table 1). All solutions

were prepared in a horizontal laminar air-flow hood using aseptic technique (6) as recommended by the Brazilian National Coordinating Committee on Large Parenteral Volumes (7). The concentration of amino acids in solutions A and B were compared, but in the flasks A there were 25 g/litre more arginine than in flasks B. Solutions C, D, E and F were used as controls of factors that could interfere in the quantitative analysis of the amino acids, such as purity and quality of the solution components. The parenteral nutrition solutions did not contain lipids which could interfere in the amino acids analysis.

TABLE 1
Composition of samples

Composition	Solutions					
	A	B	C	D	E	F
Glucose (g/liter) ^a	250.0	250.0	-	-	-	250.0
Amino acids (g/liter) ^b	95.8	95.8	95.8	95.8	-	-
Arginine (g/liter) ^c	35.6	10.6	-	35.6	35.6	-
Sodium chloride (mEq/liter) ^d	68.0	68.0	-	-	-	68.0
Potassium choride (mEq/liter) ^d	13.4	13.4	-	-	-	13.4
Magnesium sulfate (mEq/liter) ^d	20.8	20.8	-	-	-	20.8
Potassium phosphate (mEq/liter) ^d	20.0	20.0	-	-	-	20.0
Calcium gluconate (mEq/liter) ^d	3.0	3.0	-	-	-	3.0
Zinc (2,5 mg/ml) ^e	5.0	5.0	-	-	-	5.0
Copper (0,8 mg/ml) ^e	1.6	1.6	-	-	-	1.6
Manganese (0,4 mg/ml) ^e	0.8	0.8	-	-	-	0.8
Chromium (10,0 mg/ml) ^e	20.0	20.0	-	-	-	10.0

^a Glucose 50%, 500ml (Fresenius Laboratories, Brazil).

^b Aminosteryl 10%, without electrolytes, 500ml (Fresenius Laboratories, Brazil), Table 2

^c Arginine supplemented, 2.5% (Ajinomoto Corporation of Brazil).

^d Electrolytes (B. Braum Laboratories, Brazil).

^e Minerals (Abbott Laboratories, Brazil).

Twelve amino acids were monitored during the study. Table 2 lists the composition of the amino acids solution (Aminosteryl 10% ®) utilized in the study. The influence of temperature and light on amino acid concentrations in the solutions, with and without arginine, were studied by submitting the samples to -20°C, 5°C and 25°C and those which were kept at 25°C under constant fluorescent light or darkness. The pH of the solutions were determined in parallel with amino acid analysis. In this way the conditions of an hospital infirmary were simulated (25°C). Aliquots from all flasks were removed in intervals of 12, 36 and 72 hours, 7

and 28 days and their amino acid concentrations were determined. The color of each solution was observed as an indicative of qualitative degradation of components.

TABLE 2
Composition of amino acids of solution*

Amino acid	Amount (g/liter)
L-Threonine	4.2
Glycine	15.9
L-Alanine	15.0
L-Valine	5.9
L-Methionine	4.1
L-Isoleucine	4.6
L-Leucine	7.0
L-Phenylalanine	4.8
L-Lysine	5.9
L-Histidine	2.8
L-Arginine	10.6
L-Proline	15.0

*Aminosteryl 10% (95.8g/liter), without electrolytes, Fresenius Laboratories, Brazil.

Microbiological assays

Analysis of microbiological growth were performed at intervals of both zero-time and 28 days. Aliquots were inoculated in thioglycolate and Sabourand culture medium.

Amino acid analysis

Amino acid analysis were performed in a Hitachi L-8500 amino acid analyzer using high resolution ion exchange column and ninhydrin post-column detection. The variation coefficient of amino acid analysis, determined at the beginning and at the end of each analysis was 1.0%.

Statistical analysis

Data were analyzed with Student's *t* test and statistical significance was determined as $p < 0.05$.

RESULTS

Significant variations were not found in the amino acids concentrations of solutions with and without supplementation of arginine (samples A and B respectively) stored at -20°C and 5°C; therefore, the results obtained at -20°C were omitted from Tables 3 and 4. For the purpose of comparison between solutions, 5°C was considered as the ideal storage temperature, since the samples stored at that temperature presented lower amino acid degradation (Tables 3 and 4).

TABLE 3

Average percentage of remaining amino acids in parenteral nutrition solutions, supplemented with arginine (Sample A)

Amino acids	28 days		
	5°C	25°C Sheltered from light	25°C In presence of light
Threonine*	99.4 ± 0.01	89.0 ± 0.01	87.0 ± 0.01
Glycine	99.5 ± 0.07	98.1 ± 0.10	97.9 ± 0.03
Alanine	99.2 ± 0.01	99.2 ± 0.02	99.6 ± 0.03
Valine	99.8 ± 0.04	99.9 ± 0.01	99.2 ± 0.02
Methionine*	98.6 ± 0.02	88.0 ± 0.08	86.0 ± 0.01
Isoleucine*	99.3 ± 0.01	89.2 ± 0.04	86.0 ± 0.03
Leucine*	98.4 ± 0.03	90.1 ± 0.04	88.0 ± 0.04
Fenilalanine	99.5 ± 0.01	99.3 ± 0.01	99.0 ± 0.01
Lysine*	97.0 ± 0.02	90.0 ± 0.01	87.0 ± 0.01
Histidine	97.4 ± 0.01	96.3 ± 0.03	96.0 ± 0.04
Arginine	99.0 ± 0.05	99.0 ± 0.06	90.0 ± 0.09
Proline*	99.0 ± 0.06	89.5 ± 0.01	87.0 ± 0.07

*Average percentage degraded based on 100% present at zero-time control ±SD, p<0.05 (5°C x 25°C, sheltered from light ; 5 °C x 25°C, in presence of light; 25°C, sheltered from light x 25°C, in presence of light).

TABLE 4

Average percentage of remaining amino acids in parenteral nutrition solutions, without arginine supplemented (Sample B)

Amino acids	28 days		
	5°C	25°C Sheltered from light	25°C In presence of light
Threonine*	96.0 ± 0.02	90.8 ± 0.08	89.8 ± 0.09
Glycine	99.4 ± 0.10	99.1 ± 0.89	98.1 ± 0.09
Alanine	99.2 ± 0.08	99.2 ± 0.53	99.6 ± 0.19
Valine	98.0 ± 0.08	98.6 ± 0.63	97.3 ± 0.05
Methionine*	98.0 ± 0.06	90.7 ± 0.57	88.0 ± 0.09
Isoleucine*	96.8 ± 0.05	90.3 ± 0.50	87.8 ± 0.01
Leucine*	98.1 ± 0.04	97.0 ± 0.64	93.1 ± 0.01
Fenilalanine	99.0 ± 0.01	99.4 ± 0.01	99.3 ± 0.01
Lysine*	99.2 ± 0.07	95.4 ± 0.09	94.1 ± 0.09
Histidine	98.0 ± 0.09	98.2 ± 0.42	98.0 ± 0.05
Arginine	99.1 ± 0.10	99.1 ± 0.70	90.9 ± 0.04

*Average percentage degraded based on 100% present at zero-time control ±SD, p<0.05. (5°C x 25°C, sheltered from light ; 5 °C x 25°C, in presence of light; 25°C, sheltered from light x 25°C, in presence of light).

Significant variations in the concentration of the amino acids were observed in the samples removed from the

solutions at intervals of 12 hours, 36 hours, 72 hours and 7 days of study.

Comparing the samples kept in the dark at 25°C with those of the same composition stored at 5°C, it was observed a decrease in the concentration of some amino acids after 28 days of storage. Arginine supplemented samples presented degradation greater than 10% in the threonine, methionine, isoleucine, leucine, lysine and proline contents (p<0.05).

Degradation smaller than 8% of the same group of amino acids (p<0.05) were observed in samples without arginine supplementation, kept in the dark at 25°C. The exception was of the aminoacid lysine which suffered degradation smaller than 5%. Samples A and B, exposed to constant fluorescent light, presented a statistically significant decrease in the content of amino acids in the 28th day (p<0.05). No significant change was observed in the compositions of amino acids in samples C, D and E. Analysis of sample F showed no amino acid as expected.

A small decrease in the pH of the solutions a through f occurred at the 28th day of observation (Table 5).

Accentuated changes in the color of the samples A and B stored at 25°C were observed. They ranged from colorless to yellow gold at the 28th day of observation, when compared to the colors of samples A and B at the zero-time control (12 hours) stored at the ideal temperature (5°C).

Microorganisms were not found at intervals of both zero-time and 28 days.

TABLE 5

Average pH of solutions*

	pH of samples (25°C, sheltered from light)					
	A	B	C	D	E	F
Zero-time	7.6	6.1	6.3	8.1	10.7	6.4
28 days	7.3	5.8	6.1	8.0	10.6	6.3

*Determined with pHmeter Sentron model 2001. Based on duplicate samples of each solution.

DISCUSSION

The degradation of the amino acids and the darkening of the parenteral nutrition solutions in samples with and without arginine supplementation (A and B) was probably caused by the Maillard Reaction (8). The Maillard Reaction is a complex sequence of reactions. The first stage of the Maillard Reaction is the condensation of the carbonyl function of glucose with the α-amino group of amino acids. The resulting Schiff base cyclize the glucose to the corresponding glucosylamine which then undergoes an Amadori rearrangement. It follows the decomposition of Amadori and Heyns products leading to

the formation of deoxydicarbonyl sugars. A third and final stage would be the formation of polymers (9, 10).

The Maillard Reaction is undesirable because, besides facilitating the degradation of amino acids, it presents an inhibitory effect in the absorption and metabolism of amino acids and sugars (11). After the formation of lysine glycosides derivatives (12), lysine absorption is inhibited and the metabolism of minerals is decreased (11).

The observation of samples A and B showed a discrete decrease of pH (Table 5). A possible reaction mechanism for this phenomenon is that during the first stage in the formation of the glycosylamine, one or more hydroxy groups of glucose are substituted by an amino group, liberating protons to the reaction environment, thereby contributing to the decrease in the pH of the solution (12).

The heightening in color observed in samples A and B kept at 25°C and in the presence of light during the 28 days of study was probably due to the fact that light can act as a catalyst, accelerating the Maillard reaction in the presence of oxygen (13) when compared to the same samples sheltered from light.

It was found that the concentrations of threonine, methionine, isoleucine, leucine and proline were decreased ($p < 0.05$) in sample with arginine-supplemented (A) submitted to 25°C. Analyzing the chemical nature of the degraded amino acids, it can be observed that, with the exception of threonine, which has a polar side chain, the amino acids methionine, isoleucine, leucine and proline have hydrophobic side chains (13). These amino acids are less soluble in water than those with polar side chains and also they are present in an ionized form in pH 6.0-7.0 (the predominant pH in our study), therefore being more ready to react with glucose through the Maillard Reaction.

The lysine, a basic amino acid which presents a positive charge in the position ϵ of its aliphatic chain, possibly had its degradation accelerated in sample with arginine-supplemented (A) at the 28th day of observation, because of a more favorable pH for the nucleophilic attack on the carbonyl group of glucose (Table 5).

The results also suggest that parenteral nutrition solutions with and without arginine supplemented can be conditioned by a period of 28 days, the temperature of 5°C, without significant alteration in the content of the amino acids.

ACKNOWLEDGMENT

This research was partially supported by PADCT and FAPDF, Brazil.

REFERENCES

1. Barbul A. Arginine and immune function. *Nutrition* 1990; 6:53-62.
2. Novaes MRCG, Lima LAM, Ribeiro JEG, Sousa MV, Morby L, Magalhães AV. Efeitos farmacológicos da suplementação dietética com arginina no tumor sólido de Walker 256. *Arch Latinoamer Nutr* 2000; 50 (3): 3-10.
3. Novaes MRCG, Lima LAM. Efeitos farmacológicos da arginina no câncer. *Arch Latinoamer Nutr* 1999; 09 (4): 4-10.
4. Furst P. New Parenteral substrates in Clinical Nutrition. Part I Introduction. New Substrates in Protein Nutrition. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48(9): 607-616.
5. Kirk SJ & Barbul A. Role of arginine in trauma, sepsis and immunity. *JPEN* 1990; 10:227-38.
6. American Society of Hospital Pharmacists ASHP. Technical Assistance Bulletin on Quality Assurance for Pharmacy-Prepared Sterile Products. *Am J Hosp Pharm* 1993; 50:2386-98.
7. National Coordinating Committee on Large-Volume Parenterals. Recommended methods for compounding intravenous admixtures in hospitals. *Am J Hosp Pharm* 1975; 32:261-70.
8. Ellis GP. The Maillard Reaction. *Advan Carbohydrate Chem* 1959; 14:63-117.
9. Dills WL. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *Am J Clin Nutr* 1993; 5 779S-787S.
10. Laegeler WL, Tio JM & Blake MI. Stability of certain aminoacids in a parenteral nutrition solution. *Am J Pharm* 1974; 31:776-779.
11. Sherr B, Lee CM & Jelesciewicz C. Absorption and metabolism of lysine Maillard products in relation to utilization of L-lysine. *J Agric Food Chem* 1989; 37: 119-122.
12. Tortorici MP, Fearing D, Inman M & Dugan M. Photoreaction involving essential amino acid injection. *Am J Hosp Pharm* 1978; 35(9):1030.
13. Foster AB & Horton D. Aspects of the Chemistry of the Amino Sugars. *Advan Carbohydrate Chem* 1959; 14:213-279.

Recibido: 20-07-2000

Aceptado: 12-06-2001

Changes in protein fractions, trypsin inhibitor and proteolytic activity in the cotyledons of germinating chickpea

Valdir Augusto Neves and Euclides Joaquim Lourenço

Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho - UNESP, São Paulo - Brasil

SUMMARY. The chickpea seed germination was carried out in 6 days. During the period it was observed a little variation on total nitrogen contents, however the non protein nitrogen was double. A decrease of 19.1 and 20.6% in relation to total nitrogen was observed to the total globulin and albumin fractions, respectively. The gel filtration chromatography on Sepharose CL-6B and SDS-PAGE demonstrated alterations on the distribution patterns of the albumin and total globulin fractions between the initial and the sixth day of germination suggesting the occurrence of protein degradation in the germination process. The assay for acid protease only appeared in the albumin fraction with casein and chickpea total globulin as substrates, whereas the former was more degraded than the latter, however the transformations detected in the protein fractions appear indicated that others enzymes could be acting during the process. The trypsin inhibitor activity had a little drop after six day of germination indicating a possible increase on the digestibility of the proteins.

Key words: Chickpea, *Cicer arietinum* L., protein fractions, germination.

RESUMEN. Variación de las fracciones proteínicas, inhibidor de tripsina y actividad proteolítica durante la germinación de las semillas de garbanzo. La germinación de las semillas de garbanzo fue realizada durante 6 días. En ese período fue observada una pequeña variación en el contenido de nitrógeno total, sin embargo el contenido de nitrógeno no proteico duplicó. Una disminución de 19,1 y 20,6% en relación al nitrógeno total fue observada para las fracciones de globulina total y albúmina, respectivamente. La cromatografía de filtración en gel de Sepharose CL-6B y PAGE-SDS demostraron alteraciones en el perfil de distribución de las fracciones albúmina y globulina total entre el inicio y final de la germinación, sugiriendo que ocurrió degradación de proteína durante el proceso de germinación. La actividad de la enzima proteasa ácida solamente fue detectada en la fracción albúmina utilizándose caseína y globulina total como sustrato de la reacción, siendo la primera mas degradada que la última, entretanto las transformaciones detectadas en las fracciones proteicas parecen indicar que otras enzimas podrían estar actuando durante ese proceso. La actividad del inhibidor de tripsina presentó pequeña alteración despues de 6 días de germinación indicando posiblemente un aumento en la digestibilidad de las proteínas.

Palabras clave: Garbanzo, *Cicer arietinum* L., fraccion protéica, germinación.

INTRODUCTION

Legumes constitute an important protein source in the human diet for large segments of the world's population, but this protein is of poor value unless subjected to heat treatments (1-4). The digestibility of legume proteins is relatively low due to the presence of antiphysiological factors and structural characteristics of the storage proteins (1,2,5). Although the beneficial effect of heat treatment has been attributed to protease inhibitor destruction, others evidences suggest that the compact structure of storage proteins could represent a resistance to mammalian digestive enzymes (3, 6-8), a factor contributing to the poor nutritive values of some legumes seeds. The albumin protein are minor and the globulin protein are major proteins from legume seeds. Unlike the latter, which are storage proteins, the former are mostly enzymic

or non-storage proteins, however the albumins were degraded during germination like the globulins (9). The protein characteristics and its mobilization during the seed germination could be a fact well explored for some species (10-16) indicating a slow hydrolysis whose mechanism of degradation control are still uncertain. Some species behaviour alteration in the principals polimeric constituents, as carbohydrates and proteins, during germination with direct consequences for nutritional value (4, 14-19). The proteins are degraded due to increased activities of endoproteases during germination of the seed (11,13). The aim of this work was to study the variations caused by germination seeds of *Cicer arietinum* L., var. IAC-Marrocos, in the nitrogen constituents, protein fractions, trypsin inhibitor activity and the proteolytic activities.

MATERIALS AND METHODS

Material

Chickpea (*Cicer arietinum* L.), cv IAC-Marrocos, were purchased from Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. Chickpea seeds were washed with water, soaked in distilled water and the seeds immersed for one minute in a solution containing 0.001% of Benlate (methyl-1-butyl carbamoyl-2-benzimidazol carbamate). After this time the solution was drained and the seeds involved in an appropriate paper (germitest paper) previously treated with Benlat solution. Germination was carried out in a chamber with excess of humidity at the temperature of 16-18°C in darkness. Only distilled water was sprayed daily during germination period. Cotyledons of 0, 2, 4 and 6 day of germinated seeds were taken up for protein studies. At the different germination periods (0, 2, 4, 6 days) seeds were taken and the sprouting separated. The seeds were manually dehulled, the air dried cotyledons and seed coats were ground, separately, to pass through a 60 mesh sieve and the cotyledon flours defatted in n-hexane (1:8), filtered and dried at room temperature. Defatted flours obtained were utilized for total, protein, non-protein nitrogen determination and for isolation of the different protein fractions.

Methods

Nitrogen determination

The total nitrogen and protein nitrogen (TCA-precipitable) were estimated by the micro Kjeldhal method (20). The non-protein N was extracted from the flour with TCA (trichloroacetic acid) 10%, homogenized in a magnetic stirrer for 1 h at room temperature and centrifuged (15000 g/40 min). The residue was reextracted (2 X), the supernatants were combined and the N determined as cited above.

Protein fractionation

Albumins and total globulins were successively extracted from defatted chickpea flour at each day germinated (1:20 flour to solvent ratio) with deionized water and 0.5 M NaCl solution as described by Sathé and Salunkhe (21). The albumins and total globulins were resuspended in distilled water and lyophilized. The lyophilized protein fractions from the ungerminated and germinated seeds were determined (triplicate) by its nitrogen contents.

Gel chromatography

Aliquots (40-60 mg) of the albumins and total globulins from ungerminated and germinated seeds were solubilized in 5 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 with 0.5 M NaCl and applied, separately, to a column packed with Sepharose CL-6B resin (2.5x100 cm), equilibrated with the same buffer. Fractions of 5.5 ml were collected with a FRAC-100 fraction

collector and the protein was monitored. The V_0 (void volume) of the column was determined by the elution of Blue dextran 2000.

Protein determination.

Protein concentration of the various solutions were determined by the method of Lowry *et al.* (22), using bovine serum albumin as a standard. On extraction procedures were utilized the nitrogen contents multiplied by the factor 6.25. Absorbance at 280 nm was also used to monitor protein in the column eluates.

Polyacrylamide gel electrophoresis.

The SDS-PAGE were performed by the method of Laemmli (23) with monomer concentration of 12.5%, bromophenol blue was used as a front marker and the proteins visualized on gels by Coomassie Blue. The MW markers employed were: cytochrome C (12,4 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (45 kDa), bovine serum albumin (67 kDa). Relative mobility was calculate relative to the migration of the bromophenol marker dye.

Protease activity

The presence of proteases in the protein extracts and the isolated fractions, germinated and ungerminated were verified by the measure of the hydrolysis grade utilizing casein at 1% as substrate. The proteolytic activity was determined utilizing as enzyme source the salt soluble extracts (NaCl 0.5 M soluble proteins) and albumin fractions for ungerminated and germinated seeds. Aliquots in triplicate were prepared for: solution of enzyme:casein, casein whitout enzyme and only enzyme; followed by incubation of the sealed tubes with parafilm in a water bath at 37°C in a buffer (potassium phosphate-citrate, pH 5.5) mixture. The reactions were initiated by the enzyme addition (NaCl soluble extract and albumin) and interrupted at different times of incubation (0, 30, 60, 90, 120 e 240 min). The tubes were removed to the bath, diluted with cold distilled water (10x) and utilized for amino nitrogen determination. The extent of hydrolysis was determined by the increase of free amino groups using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) according to the method of Fields (24) as modified by Spadaro *et al.* (25). The percent of peptide bond hydrolysis was calculated from the changes in the ratio of new amino groups in the digestion to the total number of peptide bonds in the mixture. The molar extinction coefficient for TNP- α -amino groups of 16500 M⁻¹ cm⁻¹ and an average weight of 113 g/mol for aminoacid residues in protein were used for calculation. All hydrolysis assays were performed in triplicate on 1:10 and 1:5 enzyme:substrate ratio with casein and isolated total globulin as substrates.

Trypsin inhibitor activity

Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPA) was used as a substrate for determination of the trypsin inhibitor activity according to Kakade *et al.* (5). All determinations were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

When the seeds were sprayed with 0.01% of sodium azide, small colonies of molds could be discerned around the hilum area on the seed coat after 5 days of germination. The use of Benlat allowed the seeds to germinate until 8 days, however microbial colonies appeared after 9 to 12 days of germination. Germination of Chickpea seeds were uniform under experimental conditions during 6 days. The results of Table 1 indicated 5.61% variation in the total nitrogen during germination. The non-protein nitrogen, 10% TCA non precipitable, increases about 120.96% after 6 days of germination and in relation to total nitrogen, however this represented a decrease of only 2.02% from the protein nitrogen.

TABLE 1
Changes in chickpea (vc Marrocos) nitrogen fractions during germination

Time (days)	Nitrogen (mg/g flour) ^a		
	Total	Non protein	Protein ^b
0	36.88 ± 0.39	2.29 ± 0.15	34.59
2	37.52 ± 0.88	3.81 ± 0.16	33.71
4	37.92 ± 0.87	4.40 ± 0.17	33.52
6	38.95 ± 0.73	5.06 ± 0.16	33.89

^a N expressed as mg/g decorticated flour, ^b expressed as the difference between total N₂ and non-protein N₂. Mean values ± standard deviations of three replicates.

In relation to the results in this paper, a progressive decrease in protein nitrogen was observed during 72 h germination of *Cow pea*, *Chick pea* and *Green gram* (26). Khaleque *et al.* (27) and Khalil & Mansour (4) observed an increase in the protein content after 4 and 3 days germination to chickpea and faba beans, respectively; contrary to observed by Ganesh Kumar & Venkataraman (28). The total nitrogen remained constant in 96 h germination of *Cicer arietinum* and *Phaseolus aureus* seeds with a decrease in protein nitrogen (29).

The Table 2 shows that globulins and albumin were 19.13 and 20.77% degraded after 6 days of germination, however the salt-soluble proteins remained without variation. These

values for albumin and globulin turn into relatively small values when we only consider the protein nitrogen. The dialysable nitrogen was increased in 66.86% until 6 days of the experiment and this values quantitatively represented 28.26% of the sum of albumin and globulin fractions at the initial time and 58.59% in the 6 days. Considering a little error inerent to each analysis the differences corresponded to the sum of albumin and globulin fractions degraded (27.41%). This observation indicates that these protein fractions were reduced to fragments lower than 10 kDa, as confirmed by the chromatographic and electrophoretic studies.

TABLE 2
Composition of chickpea protein fractions during germination.

Protein fraction	Nitrogen (%)		Total Protein* (N x 6.25)	
	0 days	6 days	0 days*	6 days*
Flour	3.69	3.90	23.05	24.34
Salt-soluble	2.86	3.00	77.55	77.16
Albumins	0.54	0.45	14.59	11.56
Globulins	1.69	1.44	45.85	37.08
Dialysable ^a	0.63	1.11	17.08	28.50
Insoluble ^b	0.83	0.89	22.50	22.85

* (0) (6) days germinated. ^a Difference between salt-solubles proteins and the sum of albumin and globulin. Equivalent to difference between total N and salt-soluble N.

The results presented here suggest that the degradation of albumin during chickpea germination could represent a storage function as the globulins, a fact observed with others species (9,13). Results in the literature and those presented here show a degradation of seed storage proteins during germination with a strong variation interspecies and intervarieties (11-15,18,19,26).

Chromatographic studies

On fractionation on Sepharose CL-6B gel column the albumin fraction of ungerminated chickpea flour (Figure 1) gave 4 fractions with the first eluted near the void volume (V₀) of the column and the others with V_e/V₀ values of 2.20, 2.39 and 2.90, respectively. The elution behaviour and the distribution of the fractions from albumin were modified during germination. The fraction IV showed a spread distribution (V_e/V₀), and this may indicates that have been improved from fractions of greater molecular weight (II and III) due to degradation. The Figure 2 shows the SDS-PAGE of salt-soluble proteins and albumin. The albumin fraction from ungerminated seeds shows about 19 bands with distinct

colour intensities and presenting a tick and diffuse band with a molecular weight between 12 to 20 kDa. After 6 days all bands were reduced except a majoritary one between 20-30 kDa and a diffuse band below to 20 kDa that increased its intensity. All transformations appeared to have processed after 6 days germination, indicating that the little fragments below to 12 kDa and no detected on PAGE could be resulted of these degradations.

FIGURE 1

Gel filtration chromatography on Sepharose CL-6B of albumin protein from chickpea. 47.5 mg of protein were applied to the column and fractions of 5.5 ml were collected. A to D are: 0, 2, 4 and 6 days germination, respectively

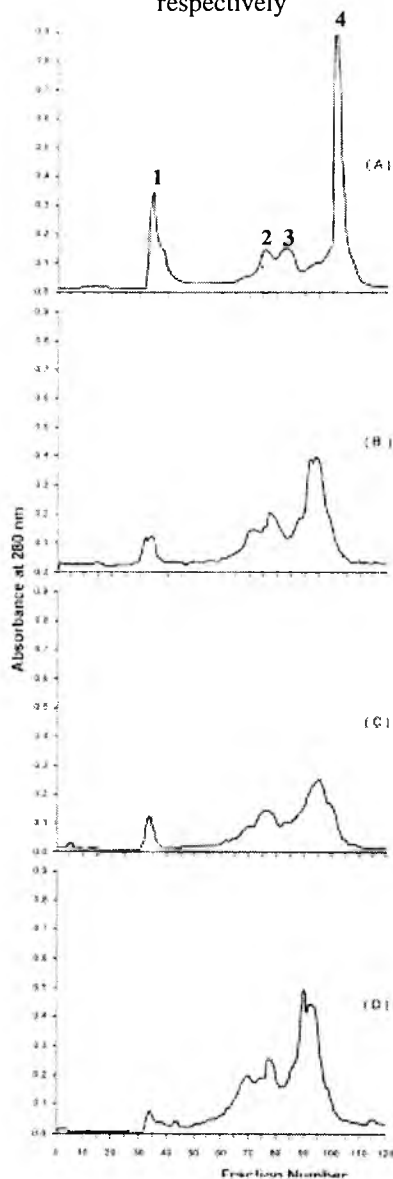
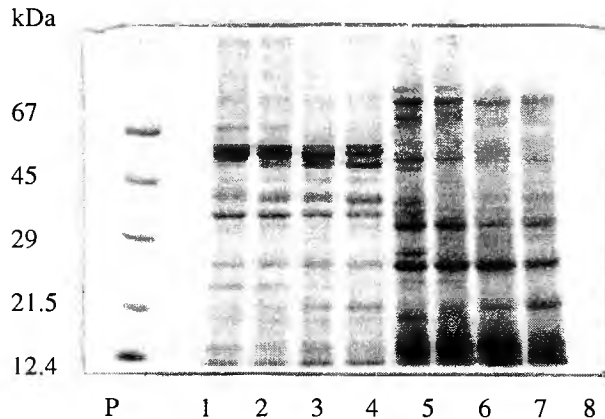


FIGURE 2

SDS-PAGE patterns of salt-soluble protein (1-4) and albumin (5-8) from chickpea during germination at 0, 2, 4 and 6 days respectively. P – standard proteins as described in methods



The elution pattern of total globulins on Sepharose CL-6B column chromatography (Figure 3) shows four fractions with the first one eluting next to the void volume (V_0) and the others with V_e/V_0 of 1.81, 2.25 and 2.90, respectively. The first fraction shown very turbid but it wasn't protein material as confirmed by PAGE and protein determination by Lowry method (22). In the sixth day this fraction had an abrupt increase as compared to the absorbance values for ungerminated one. The fraction III disappeared after two days germination while the fraction IV was duplicated in the same period, this could indicate that the latter has been enriched by the former degradation. The elution volume of the fraction II ($V_e/V_0 = 1.81$) appeared indicates a very little molecular weight modification, confirmed on SDS-PAGE, while the fraction IV was increased quantitatively, probably resulting of the enrichment by fragments from greater fractions.

The Figure 4 shows the SDS-PAGE from salt-soluble and total globulins. Accord to Table 2 the globulins corresponded to 59.12% and 48.06% of the salt soluble proteins in the initial and 6 days of seed germination. The PAGE indicates that the peptides between 45 to 66 kDa have little alteration on its relative mobility behaviour, however the bands intensities were reduced while new peptides arose in the 20-30 kDa interval and below to 20 kDa. Ahmed *et al.* (10) observed a reduction in the total protein bands number on PAGE of chickpea germinated by 7 days. G. Kumar & Venkataraman (28) results revealed a maximum degradation of the chickpea proteins in the 6^o day of germination, the authors verified alterations on the elution behaviour of the proteins on gel filtration indicating degradation as a result

of germination, the same was confirmed on SDS-PAGE with a decrease in the larger bands and the appearance of smaller ones.

FIGURE 3

Gel filtration chromatography on Sepharose CL-6B of total globulin protein from chickpea. 44.5 mg of protein were applied to the column and fractions of 5.5 ml were collected. A to D are: 0, 2, 4 and 6 days germination, respectively

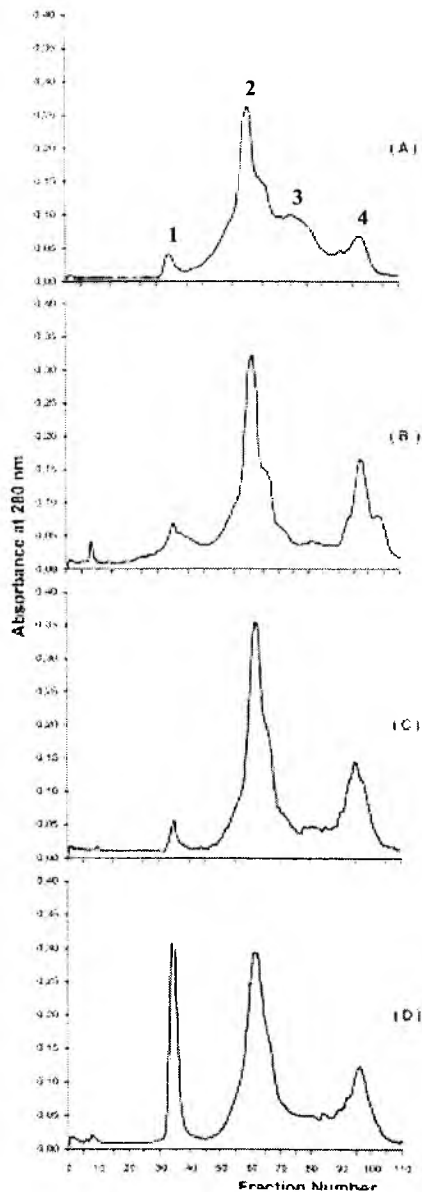
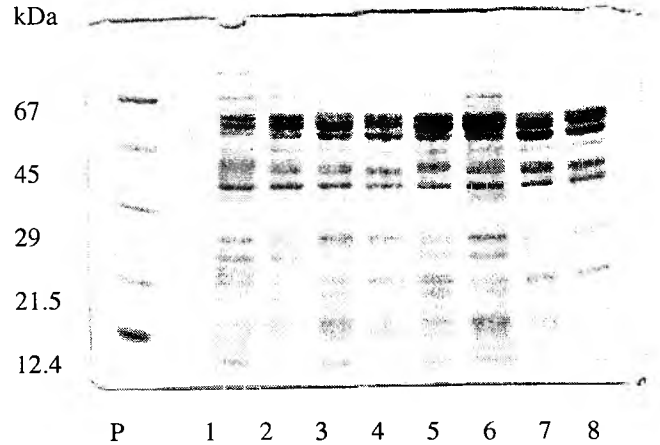


FIGURE 4

SDS-PAGE patterns of salt-soluble protein (1-4) and total globulin (5-8) from chickpea during germination at 0, 2, 4 and 6 days respectively. P – standard proteins as described in methods



The Table 3 shows the variation on trypsin inhibitor activity during seed germination. The results indicated a little change on inhibitor activity with a maximum in the fourth and a decrease until the sixth day of germination. This behaviour appeared to be followed by the increase on acid protease activity measured with casein and total globulin as substrates. No acid protease activity occurred during 6 days germination utilizing casein as substrate and chickpea salt-soluble extract as a source of enzyme in an enzyme:substrate ratio of 1:10 (data not shown), however there was an enzymatic system in the albumin fraction that hydrolyses casein and total globulin molecules into aminoacids and peptides.

TABLE 3
Trypsin inhibitor activity in chickpea flours during germination

Germination (days)	UIT/mg flour	UIT/mg protein ^a	UIT reduction (%)
0	17.35	92.62	-
2	14.05	77.82	16.0
4	11.94	69.80	24.6
6	12.14	71.49	22.8

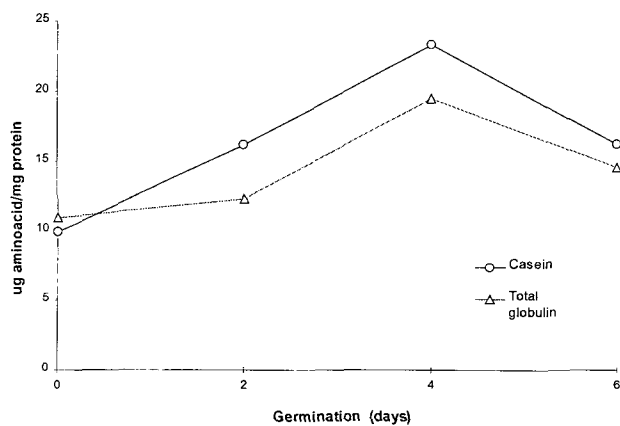
^aUIT/mg protein- trypsin inhibitor units as defined by Kakade *et al.*(5).

The Figure 5 show the acid protease activity from albumins during germination with the substrates in a 1:5

enzyme:substrate ratio. The proteolytic activity increase with germination until 4^o day for both substrates and decrease to the 6^o, however the enzymatic activity was higher to casein than total globulin. Considering the albumin to globulin ratio on chickpea seeds (3:5) the proteolytic activity could be higher than obtained in vitro. The reserve behaviour of the globulins and their degradation during germination together with the increase in the proteolytic activity is consistent with various reports (10,11,13,17). Protein degradation in the protein bodies of lentil associated to an increase in a caseinolytic system were observed after 7 days of seed germination (11).

FIGURE 5

Proteolytic activity during chickpea germination.
Enzyme source: albumin fraction from chickpea.
Substrates: casein and chickpea total globulin. The assays were performed in triplicate as described in methods



The decrease in the total and storage proteins were associated with two different sets of enzymes during lentil seed germination (13). Nielsen & Liener (17) also observed a different protease activity during *Phaseolus vulgaris* seed germination when associated with trypsin like activity or azocasein activity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish thank to GUILHERME VANNUCCHI PORTARI for technical assistance, the Research Commission Program of the Faculty of Pharmaceutical Sciences-UNESP (PADC-FCF-UNESP) and CNPq-PIBIC Program.

REFERENCES

1. Aykroid, WR & Dought I. Legume in human nutrition. FAO Nutritional, 1964;191-138.

2. Sgarbieri VC. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas de plantas da família Leguminosae. Cienc Cult. 1980;32:78-85.
3. Chavan JK, Kadan SS, Salunkhe DK. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum L.*) seeds. CRC-Crit.Rev. Food Sci Nutr. 1988;25:107-158.
4. Khalil AH & Mansour EH. The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. Food Chem. 1995;54:177-82.
5. Kakade ML, Rackis JJ, Mcghee JE, Puski G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 1974;51:376-82.
6. Neves VA & Lourenço EJ. Isolation and in vitro hydrolysis of globulin G.1 from lentils (*Lens culinaris Medik.*). J Food Biochem. 1995;19:109-120.
7. Neves VA, Lourenço EJ, Silva MA. Isolation and in vitro hydrolysis of lentil protein fractions by trypsin. Arch Latinoamer Nutr. 1996;46:238-42.
8. Singh U. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum L.*) Current status and future research needs. Qual.Plant-Plant Foods Hum Nutr. 1985;35:339-351.
9. Murray DF. A strong role for albumins in pea cotyledons. Plant Cell Environ. 1979;2:221-26.
10. Ahmed FAR, Abdel-Ralim EAM, Abdel-Fatah OM, Erdman VA, Lippman C. The changes of protein patterns during one week of germination of some legume seeds and roots. Food Chem. 1995;52:433 - 437.
11. Alvarez J & Guerra H. Biochemical and morphological changes in protein bodies during germination of lentil seeds. J Expl Botany. 1985; 36:1296-1303.
12. Chang KC & Harrold RL. Changes in selected biochemical components, in vitro protein digestibility and aminoacids in two bean cultivars during germination. J Food Sci. 1988;53:783-804.
13. Guerra H & Nicolás G. Changes in nitrogen fraction and proteolitic activities in the cotylédones of germinating lentils. Rev Esp Fisiol. 1983;39:277- 282.
14. Duranti M, Cuchetti E, Cerletti P. Changes in composition and subunits in the storage proteins of germinating lupin seeds. J Agric Food Chem. 1984;32:490-93.
15. Sathe SK, Deshpande SS, Reddy NR, Goll DE, Salunkhe DK. Effect of germination on protein, raffinose oligosaccharides and antinutritional factors in the Great northern bean (*Phaseolus vulgaris L.*). J Food Sci. 1983;48:p. 1796-1800.
16. Satwadhkar PN, Kadam SS, Salunkhe DK. Effects of germination and cooking on polyphenols and in vitro digestibility of horse gram and moth bean. Qual.Plant-Plant Foods Hum Nutr. 1981; 31:71-76.
17. Nielsen SS & Liener IE. Degradation major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. Plant Physiol. 1984;74:494 - 498.
18. Mamta-Chadna & Matta NK. Studies on changing protein levels in developing and germinating seeds of *Lathyrus sativus*. J Plant Biochem Biotechnol. 1994;3:59-61.
19. Shastry M & Jhon E. Biochemical changes and in vitro protein digestibility of the endosperm of germinating *Dolichos lablab*. J Sci Food Agric. 1991;55:529-538.

20. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 11, ed. 1970.
21. Sathe, S.K. & Salunkhe, D.K. Solubilization and electrophoretic characterization of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins. J Food Sci. 1981;46:82-87.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75.
23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-84.
24. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS. Meth. Enzymol. 1972;25:464-68.
25. Spadaro ACC, Dragheta W, Del Lama SN, Camargo ACM, Green LT. A convenient manual trinitrobenzenesulphonic acid method for monitoring aminoacids and peptides in chromatography effluents. Anal. Biochem.1997;96:317-21.
26. Ganesh Kumar K & Venkataraman LV. Changes in reserve proteins of cow pea, chick pea and green gram during germination: Fisico-Chemical Studies, J Food Sci Technol. 1975;12:292-95, 1975.
27. Khaleque A, Elias LG, Braham JE, Bressani R. Studies on the development of infant foods from plant protein sources. Part I - Effect of germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.) on the nutritive value and digestibility of proteins. Arch Latinoamer Nutr. 1985;35: 315-25.
28. Ganesh Kumar K & Venkataraman LV. Chickpea seed proteins:Modification during germination. Phytochemistry, 1978;17:605-609.
29. Jaya TV & Venkataraman LV. Effect of germination on the nitrogen constituents, essential aminoacids, carbohydrates, enzymes and antinutritional factors in chickpea and greengram. Indian Food Packer 1980;34:3-11.

Recibido: 08-08-2000

Aceptado: 11-04-2001

O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose

Amar Costa de Oliveira, Keila da Silva Queiroz, Elizabete Helbig, Soely Maria Pissini Machado Reis, Francisco Carraro

Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

RESUMO. Avaliou-se o efeito da maceração e do processamento doméstico do feijão-comum na composição química, nos teores de fitatos, de taninos, de amido e de fatores de flatulência, utilizando os seguintes tratamentos: feijão-comum cru (FC), cozido sem maceração liofilizado (FCSM), cozido sem água de maceração não absorvida liofilizado (FCSAM), cozido com água de maceração não absorvida liofilizado (FCCAM) e na água de maceração (AM). Os feijões foram macerados por um período de 16 horas, na proporção 3:1 (água:feijão), em temperatura ambiente. Através de ensaio biológico com ratos machos Wistar, estudou-se o efeito de fitatos e taninos no quociente de eficiência protéica líquida (NPR) e digestibilidade protéica. Observou-se redução nos teores de fitatos (85%) pela utilização da maceração. No caso do conteúdo de taninos, somente o processo de cozimento do feijão promoveu alta decomposição dos mesmos (84%). No tratamento (FCSAM) observou-se redução nos teores de rafinose (25,0%), estaquiose (24,8%) e verbascose (41,7%) e no teor de amido (26,8%). No ensaio biológico observou-se que o NPR da dieta controle (caseína) e da dieta caseína mais sólidos solúveis da água de maceração, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$); entre os tratamentos de feijão também não houve diferença significativa, sendo os valores dos NPR menores do que aqueles da caseína. A digestibilidade do tratamento (FCSM) foi a maior dentre os tratamentos de feijão ($74,3\pm 5,8\%$); a caseína apresentou valor de $94,6\pm 0,9\%$. A remoção dos fatores antinutricionais fitatos e taninos, teor de amido e dos fatores de flatulência do feijão-comum foi mais efetiva no tratamento onde a água de maceração não absorvida era descartada (FCSAM).

Palavras chave: Feijão-comum, maceração, fitatos, taninos, oligossacarídeos tipo rafinose, amido, proteína, valor nutritivo

INTRODUÇÃO

As leguminosas são importantes fontes de proteínas, vitaminas, carboidratos e minerais. Contudo, a presença de fatores antinutricionais e os níveis de oligossacarídeos causadores de flatulência limitam a utilização deste alimento

SUMMARY. The domestic processing of the common bean resulted in reduction in the antinutritional factors phytates and tannins, in the starch content and in the flatulence factors raffinose, stachiose and verbascose. The objective of this study was to evaluate the effect of the soaking step and the domestic processing of the common bean, on the chemical composition, the levels of phytate, tannin, starch and flatulence factors by utilizing the follows treatments: raw bean (FC), freeze-dried cooked unsoaked bean (FCSM), freeze-dried cooked bean without the non-absorbed soaking water (FCSAM), freeze-dried cooked bean with the non-absorbed soaking water (FCCAM) and the soaking water (AM). The beans were soaking for a period for 16 hours in the proportion 3:1 (water:beans) at room temperature. The effect of the phytates and tannins on the net protein efficiency ratio (NPR) and protein digestibility using male Wistar rats were studied. A decrease in the phytate content of the beans (85%) with use of soaking was observed. In the case of the tannin content, only the cooking of the beans promoted high decomposition (84%). In the (FCSAM) treatment a decrease in the raffinose (25.0%), stachiose (24.8%), verbascose (41.7%) and starch (26.8%) contents was observed. Diets containing casein (control), casein plus the soluble solids obtain from the soaking water showed no significant difference ($p>0.05$) for the NPR, as well as for the different bean treatments, although these showing lower values. The treatment (FCSM) showed the higher digestibility ($74.3\pm 5.8\%$) of the bean treatments, the casein diets showing $94.6\pm 0.9\%$. The reduction of the phytates, tannin, starch contents and flatulence factors in the common bean was most effective when the soaking water not absorbed was discarded (FCSAM).

Keywords: Common bean, soaking, phytates, tannins, raffinose-type oligosaccharides, starch, protein, nutritive value

(1,2). No Brasil, a produção de grãos no ano de 1995 foi de 2.946.267 toneladas (3). Os processamentos domésticos e os métodos de cocção são conhecidos por reduzirem os fatores antinutricionais melhorando o valor nutricional das leguminosas (4).

Nas sementes de leguminosas, o ácido fítico faz parte de

aproximadamente 70% do conteúdo de fosfato, sendo estruturalmente integrado com proteínas e/ou minerais na forma de complexos (5). De acordo com Torre *et al.* (6), sob condições fisiológicas, o ácido fítico é fortemente ionizado e capaz de interagir extensivamente com proteínas e íons metálicos. Muitos desses complexos são insolúveis e biologicamente indisponíveis para seres humanos em condições fisiológicas normais. Os taninos, fenóis condensados, são considerados potentes inibidores de enzimas devido a sua complexação com proteínas enzimáticas (7). A grande tendência dos taninos para formar complexos com proteínas ao invés de carboidratos e outros polímeros, pode explicar a baixa digestibilidade das proteínas das leguminosas, inibição do crescimento e aumento da excreção de nitrogênio fecal em animais (8,9).

Nas leguminosas, o amido é o principal carboidrato do ponto de vista quantitativo, e os oligossacarídeos tipo rafinose estão em pequenas mas significativas quantidades. Algumas investigações evidenciam que os oligossacarídeos tipo rafinose causam flatulência e sensação de desconforto após ingestão de feijão (10). Os efeitos da flatulência são causados pela falta de atividade da enzima α -galactosidase (E.C.3.2.1.22) no trato digestivo de humanos e de animais experimentais, pois os oligossacarídeos tipo rafinose ao passarem pelo intestino grosso são anaerobicamente fermentados, produzindo gases como o H_2 , CO_2 e CH_4 podendo causar flatulência, diarreia e dor abdominal (11). Com relação à maceração, embora certos fatos sejam conhecidos, como a redução do tempo de cozimento do feijão com a embebição dos grãos, aspectos mais profundos, como a existência no próprio feijão da enzima alfa-galactosidase, o que levaria, pelo menos em parte, à clivagem das ligações alfa-galactosídicas dos oligossacarídeos tipo rafinose, presentes no feijão e causadores de flatulência (12), ou a atividade desta enzima devido à microflora do intestino grosso (13), faz com que os oligossacarídeos tipo rafinose presentes em leguminosas continuem objeto de estudo.

No processamento doméstico do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), a maceração dos grãos crus em água por 12 a 16 horas, durante a noite, é prática corrente, e apesar deste procedimento ser secular, está baseado apenas na experiência, sem caráter científico, sendo portanto empírico. Entretanto, alguns autores têm pesquisado sobre o efeito dos tratamentos caseiros de feijão, incluindo maceração prévia a cocção, no seu valor nutritivo e nos hábitos preferenciais dos consumidores (14-16). Outros estudos demonstraram que existe uma importante diminuição em oligossacarídeos tipo rafinose, amido e fatores antinutricionais em feijão cozido ou feijão macerado e cozido (17,18).

Objetivou-se através deste estudo avaliar o efeito da maceração e do processamento doméstico do feijão-comum, mais particularmente, na composição química, nos teores de

fitatos, de taninos, de amido e dos fatores de flatulência (oligossacarídeos tipo rafinose) em feijão-comum macerado e não macerado liofilizado, com e sem uso de água de maceração não absorvida, e na água de maceração.

MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria-prima utilizada foi feijão-comum IAC-Carioca, proveniente do Instituto Agronômico, Campinas, SP, Brasil. A matéria-prima foi submetida a diferentes tratamentos; dois tratamentos de feijão (proporção feijão:água de 1:3) foram submetidos à maceração por 16 horas à temperatura ambiente, cozidos em panela de pressão doméstica por 40 minutos após saída constante de vapor pela válvula de pressão. Um destes tratamentos foi cozido com a água de maceração não absorvida pelos grãos e o outro sem a água de maceração, ao qual foi acrescentado água para o cozimento. Foi feito um terceiro tratamento onde o feijão foi cozido sem maceração, nas mesmas condições de cozimento. Os feijões cozidos foram congelados em freezer doméstico e posteriormente liofilizados (liofilizador Virtis modelo N° 10-146 MR-BA) sendo então triturados na forma de farinha com granulometria 70 mesh. Utilizou-se também caseína comercial com teor protéico 80,2%, proveniente de M. Cassab Comércio e Indústria Ltda.

Composição centesimal

Nos feijões cru e cozido sem maceração e liofilizado foram determinadas as seguintes características composicionais: lipídeos totais (19); proteína bruta pelo método semimicro Kjeldahl (20), utilizando-se como catalizador na fase da digestão o dióxido de titânio (21), utilizando-se 5,40 como fator de conversão de nitrogênio para proteína (22); cinzas (23); umidade (24); fibra bruta segundo procedimento utilizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil (25) e carboidratos determinados por diferença, usando a fórmula: $100 - (\text{proteína bruta} + \text{lipídeos totais} + \text{fibra bruta} + \text{cinzas})$. O conteúdo de proteína bruta na caseína utilizada nas dietas experimentais foi calculado utilizando-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio para proteína de caseína (26). As análises foram feitas no mínimo em triplicata.

Fitatos e taninos

As análises de fitatos e taninos foram feitas em feijão cru, feijão cozido sem maceração liofilizado, feijão cozido com maceração com e sem uso da água de maceração não absorvida pelos grãos liofilizados, e também na água de maceração. A determinação do conteúdo de fitatos seguiu metodologia proposta por Latta & Eskin (27). Os fitatos foram extraídos de 5g de farinha de feijão cru com 100ml HCl (2,4%) em agitação por 1 hora à temperatura ambiente,

seguida de centrifugação (Centrifuga Modelo RC5C, Sorvall Instruments DuPont) a 3000rpm por 10 minutos. Coletou-se 1ml do sobrenadante, em triplicata, e diluiu-se em balão volumétrico de 25ml em água destilada. Após, 10ml da amostra submetida à diluição foi eluída em coluna com resina de troca aniônica AG1-X8, inicialmente com 15ml de solução de NaCl 0,1M e por último com 15ml de solução de NaCl 0,7M para remoção de fitatos da amostra. Ato contínuo à extração, adicionou-se em tubos de ensaio 1ml da solução de Wade (0,03% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,3% ácido sulfossilicólico em água destilada) e 3ml de extrato da solução de NaCl 0,7M. O branco da reação foi feito utilizando-se 3ml de água destilada e 1ml da solução de Wade. Posteriormente, as amostras foram deixadas em repouso por 15 minutos e então foram lidas a 500nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70. A curva padrão foi elaborada a partir de concentrações crescentes da solução de fitato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Todas as análises foram feitas no mínimo em triplicata. Para determinação de taninos, seguiu-se a metodologia proposta por Deshpande *et al.* (28). A extração deu-se a partir de 0,5g de farinha de feijão cru, com adição de 20ml de metanol em constante agitação por 20 minutos. Após, a amostra foi filtrada e recolhidos 2ml do sobrenadante; a este acrescentou-se 2,5ml de HCl em metanol a 8%, em triplicata; a seguir, adicionou-se 2,5ml de vanilina 1% em metanol; ao branco adicionou-se 2,5ml de metanol e 2,5ml de vanilina. Após 20 minutos a 30°C, foi lida a absorbância a 500nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70. A curva padrão foi elaborada com catequina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), 1mg/ml em metanol. Usou-se diluições 0, 1, 2, 5 e 10mg/ml em solução de metanol para obter-se a curva padrão, sendo que a porcentagem de taninos foi calculada como sendo aproximadamente 42% do equivalente de catequina, baseando-se na curva padrão. As análises foram feitas no mínimo em triplicata, com 5 repetições de cada.

Amido

A determinação de amido, em termos de substâncias sacarificáveis totais, seguiu o método clássico de Bergeret (29), com modificações para as condições de trabalho. Utilizou-se como amostra, 10g de farinha de feijão cru, feijão cozido com água de maceração não absorvida liofilizado, feijão cozido sem água de maceração liofilizado, feijão cozido sem maceração liofilizado, e 10ml de água de maceração. As amostras foram transferidas para balão volumétrico de fundo chato de 250ml. Adicionou-se 75ml de água destilada e 15ml de ácido clorídrico concentrado. Procedeu-se a destilação ao refluxo por 2 horas. Após resfriar o balão, filtrou-se com lã de vidro e neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio 2N, utilizando-se papel indicador. As amostras foram levadas a volume com água destilada para se

obter 200ml de solução. Determinou-se as substâncias sacarificáveis totais por titulação segundo o método de Eynon e Lane (30), com modificações para as condições de trabalho, utilizando-se Aparelho de Oxirredutimetria por Titulação, modelo TE da Tecnal. Determinou-se os teores de amido multiplicando-se o resultado encontrado pelo fator 0,90. As análises foram feitas no mínimo em triplicata.

Oligossacarídeos tipo rafinose

Os oligossacarídeos foram extraídos de 10g de farinha de feijão cru, feijão cozido com água de maceração liofilizado, feijão cozido sem água de maceração liofilizado, feijão cozido sem maceração liofilizado, e 10ml de água de maceração com 100ml de etanol a 80%, utilizando-se destilação ao refluxo por 15 minutos, seguido de filtração em funil de vidro Hermex com placa porosa nº1 (31). O resíduo foi reextraído duas vezes e lavado com água destilada até que o Teste da Reação de Molisch (32) desse negativo. Completou-se o volume a 100ml e usou-se alíquotas deste extrato, filtrado em membrana Milipore (ME 0,45 μm ×47mm), para a análise cromatográfica. As determinações foram realizadas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), provido de bomba (Varian 9012), utilizando o programa de bomba Star Chromatography Workstation e detector de índice de refração (Varian Star 9040 IR). Utilizou-se as seguintes condições cromatográficas: coluna revestida com grupos NH_2 ; acetonitrila-água ultra pura (75:25) como fase móvel, velocidade de fluxo de 1ml/min, volume de injeção de 20 μl e detector de índice de refração (33). Padrões de rafinose e estaquiose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) diluídos em água ultra pura foram utilizados para estudar a linearidade da concentração dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose em relação às áreas dos picos e construção da curva de calibração, através de injeções de soluções com concentrações de 0,25, 0,50 e 1,00mg/ml. A quantificação de cada oligossacarídeo foi feita por comparação da altura dos picos com os correspondentes padrões, no mínimo em triplicata. À exceção do oligossacarídeo verbascose, para o qual a quantificação seguiu-se por comparação da área dos picos e do tempo de retenção em relação aos oligossacarídeos rafinose e estaquiose, conforme relatos na literatura (34-37), que quantificaram o oligossacarídeo verbascose em leguminosas por métodos cromatográficos, verificando que este oligossacarídeo apresenta um tempo de retenção aproximado entre 20-25 minutos após o início da corrida cromatográfica.

Ensaio biológico

Para o ensaio biológico foram elaboradas 6 dietas (tratamentos), sendo que dois tratamentos tiveram como fonte protéica a caseína e a um deles adicionou-se os sólidos

solúveis encontrados na água de maceração descartada na cocção, para fins comparativos; os outros três tratamentos tiveram como fonte protéica feijão-comum cozido liofilizado. Dois tratamentos de feijão (proporção feijão:água 1:3) foram submetidos a maceração por 16 horas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), cozidos em panela de pressão doméstica por 40 minutos após saída constante de vapor pela válvula de pressão. Um destes tratamentos foi cozido com a água de maceração não absorvida e o outro sem a água de maceração ao qual foi acrescentado água para o cozimento. Foi feito um terceiro tratamento onde o feijão foi cozido sem maceração sob as mesmas condições de cozimento. Os feijões cozidos foram congelados em freezer doméstico e depois liofilizados, sendo então moídos em forma de farinha. Também foi elaborada dieta aprotéica. As dietas purificadas eram formuladas segundo o "American Institute of Nutrition" (38), dieta AIN 93-G, para ratos em crescimento, à exceção do teor protéico, para determinação dos índices de qualidade protéica (39). Foram liofilizados 3,6 litros de água de maceração (1,2kg de feijão), que originaram 8,35g de sólidos solúveis (contendo 1,37g de fitatos e 0,61g de taninos) que foram adicionados a uma das dietas de caseína. Foram utilizados oito ratos Wistar recém-desmamados (48,4±6,4g) por tratamento, em gaiolas individuais, com alimentação e água *ad libitum*, sendo o Laboratório de Ensaios Biológicos mantido com temperatura e umidade relativa de 23±1°C e 50-60%, respectivamente, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

TABELA 1

Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico

Ingredientes	Dieta ¹		
	Caseína*	Feijão**	Aprotéica
Feijão	—	617	—
Amido de milho	453	—	603
Caseína	150	—	—
Amido dextrinizado	132	167	132
Sacarose	100	86	100
Óleo de soja	70	70	70
Fibra (celulose)	50	15	50
Mistura vitamínica ²	10	10	10
Mistura mineral ³	35	35	35

¹ Valores em g/kg de dieta (AIN 93-G).

^{2,3} Segundo formulação da AIN 93-G.

*Dieta controle (caseína) e dieta de caseína mais sólidos solúveis encontrados na água de maceração.

** Dieta de feijão cozido sem maceração, feijão cozido sem água de maceração e feijão cozido com água de maceração liofilizados.

Tratamento estatístico

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA e testes de confronto de médias, de Duncan e Tukey, usando o programa Statistica, considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal do feijão-comum utilizado encontra-se na Tabela 2. Os resultados dessa análise serviram de base para o cálculo das dietas experimentais usadas no ensaio biológico.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de fitatos e taninos.

TABELA 2

Composição centesimal do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca, cru (FC) e cozido liofilizado sem maceração (FCSM)

Componentes	*FC	*FCSM
Proteínas	18,4±0,1	19,8±0,1
Lipídeos	2,3±0,0	2,5±0,1
Cinzas	0,6±0,0	0,7±0,0
Fibras	4,6±0,1	5,7±0,2
Umidade	9,4±0,0	1,5±0,1
Carboidratos**	64,7	69,2

*Dados apresentados em base seca (média±desvio-padrão, no mínimo n=3)

**Determinados por diferença

TABELA 3

Quantificação de fitatos e taninos nos diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca, em base seca, e na água de maceração

Tratamento	mg fitatos/g feijão	mg taninos/g feijão
Feijão Cru	13,82±0,57 ^a	13,78±0,57 ^a
FCSM*	11,20±0,67 ^b	2,24±0,25 ^b
FCSAM**	2,04±0,05 ^c	1,63±0,31 ^b
FCCAM***	2,29±0,64 ^c	1,73±0,29 ^b
Água de Maceração****	0,51±0,01	0,12±0,01

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) (média±desvio-padrão, no mínimo n=3).

*Feijão cozido sem maceração.

**Feijão cozido sem água de maceração.

***Feijão cozido com água de maceração.

****valores expressos em mg/ml.

Observando-se os teores de fitatos demonstrados na Tabela 3, verificou-se que nos tratamentos submetidos à maceração ocorreu notável redução desses componentes, o que foi também constatado em estudo realizado por Barampama & Simard (18). Pôde-se observar redução no teor de fitatos de 19%, 85% e 84% nos tratamentos FCSM, FCSAM e FCCAM respectivamente, em relação ao feijão cru. A redução deste fator antinutricional é de grande importância, uma vez que altos níveis de ingestão de fitatos podem estar associados com efeitos nutricionais adversos ao homem (40); em condições fisiológicas normais, o ácido fítico é fortemente ionizado e capaz de interagir com proteínas e íons metálicos (41), tornando estes complexos insolúveis e biologicamente indisponíveis aos seres humanos.

Com relação ao conteúdo de taninos, verificou-se que somente o processo de cozimento do feijão, promoveu acentuada redução dos mesmos; tal fato foi confirmado por outros autores (18,40,41,42). A redução do teor de taninos foi de 84% para FCSM, 88% para FCSAM e 87% para FCCAM comparando-se ao FC, o que conferiu ao processo e ao método eficácia na redução deste componente capaz de interferir no valor nutritivo desta leguminosa; os taninos formam complexos com proteínas diminuindo a digestibilidade, inibindo o crescimento e aumentando a excreção de nitrogênio fecal em animais (8).

Na Tabela 4 estão demonstrados os valores de oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose quantificados por HPLC nos diferentes tratamentos de feijão.

TABELA 4
Quantificação de oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose por HPLC, nos diferentes tratamentos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca, em base seca, e na água de maceração

Tratamento	Rafinose (g/100g)	Estaquiase (g/100g)	Verbascose (g/100g)
Feijão cru	0,40±0,03 ^a	3,23±0,18 ^a	0,12±0,01 ^a
FCSM*	0,32±0,04 ^b	2,95±0,15 ^{bd}	0,08±0,00 ^b
FCSAM**	0,30±0,02 ^b	2,43±0,04 ^c	0,07±0,00 ^b
FCCAM***	0,48±0,02 ^c	2,85±0,07 ^d	0,10±0,01 ^{ab}
AM****	0,11±0,03	0,24±0,02	0,04±0,01

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) (média±desvio-padrão, no mínimo n=3).

FCSM* Feijão cozido sem maceração e liofilizado.

FCSAM** Feijão cozido com água de maceração e liofilizado.

FCCAM*** Feijão cozido com água de maceração e liofilizado.

AM**** Água de maceração (valores expressos em g/100ml de água de maceração).

Na Tabela 4, comparou-se os teores de oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose dos diferentes tratamentos. Observou-se redução nos teores dos oligossacarídeos rafinose (20,0% e 25,0%), estaquiase (8,7% e 24,5%) e verbascose (33,3% e 41,7%) para os tratamentos FCSM e FCSAM, respectivamente, em relação ao feijão cru. Observou-se também que o oligossacarídeo verbascose foi o oligossacarídeo encontrado em menor quantidade. A redução dos oligossacarídeos tipo rafinose após o processamento doméstico de cocção seguida de maceração onde a água de maceração não absorvida pelos grãos era descartada (FCSAM), demonstra a hidrossolubilidade destes oligossacarídeos. As mudanças que ocorrem nos teores de açúcares, especificamente nos teores de oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose, nos processos de maceração e de cocção, associados ou não, podem ser atribuídas ao metabolismo nos grãos, à difusão de componentes para a água de maceração e à influência do crescimento de microrganismos na água de maceração (43). Os teores dos oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose encontrados estão em concordância com outros autores (43-48).

O teor do amido (substâncias sacarificáveis totais) encontrado para os tratamentos feijão cru, feijão cozido sem maceração liofilizado, feijão cozido com água de maceração liofilizado, valores expressos em g/100g em base seca, e água de maceração, valores expressos em g/100ml de água de maceração, foram respectivamente: 46,76±0,05, 40,19±0,00, 34,21±0,06, 36,91±0,07 e 0,27±0,00. Verificou-se que o teor de amido diferiu ($p < 0,05$) entre o tratamento feijão cru e os demais tratamentos de feijão, que apresentaram uma redução no teor; portanto, o processamento doméstico de maceração associado ou não à cocção, contribuiu para uma sensível redução nos teores de substâncias sacarificáveis totais (49,50). As mudanças físico-químicas que ocorreram nos grãos e na água durante a maceração e na cocção, ou seja, as mudanças na estrutura resultante do grão, poderiam facilitar a extração de componentes hidrossolúveis, bem como ativar enzimas endógenas do grão causando degradação e liberação de constituintes.

Nas Tabelas 5 e 6, estão dispostos os resultados encontrados para NPR e digestibilidade.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados referentes a ganho de peso, consumo de dieta e NPR encontrados no ensaio biológico. Para o tratamento aprotéico obteve-se -4,7g±1,2g, como perda de peso média e consumo de dieta médio de 40,0g±4,7g. Observou-se ainda que, nas dietas cuja fonte protéica era caseína, nenhum dos índices apresentaram diferenças significativas, indicando que tanto os fitatos quanto os taninos contidos no feijão não afetaram diretamente a utilização líquida da proteína. Com relação aos tratamentos

com feijão, verificou-se que os mesmos não diferiram entre si quanto ao ganho de peso e NPR, diferindo somente o feijão cozido sem maceração dos demais, quanto ao consumo de dieta, que apresentou valor maior.

TABELA 5
Ganho de peso, consumo de dieta e NPR das fontes proteicas experimentais do ensaio biológico com ratos Wistar machos recém-desmamados

Tratamentos	Ganho Peso	Consumo de Dieta	NPR
Caseína Controle	52,2±6,2 ^a	119,6±10,5 ^a	4,1±0,4 ^a
CSS*	48,5±5,6 ^a	117,0±5,4 ^a	3,9±0,5 ^a
FCSM**	21,8±4,0 ^b	72,8±10,0 ^b	2,9±0,4 ^b
FCSAM***	18,8±3,9 ^b	60,4±7,1 ^c	2,9±0,6 ^b
FCCAM****	18,2±4,9 ^b	68,2±6,6 ^{b,c}	2,8±0,2 ^b

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

*Caseína + sólidos solúveis.

**Feijão cozido sem maceração.

***Feijão cozido sem água de maceração.

****Feijão cozido com água de maceração.

TABELA 6
Digestibilidade aparente e verdadeira (%) *in vivo*, de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca

Tratamento	Digestibilidade Aparente	Digestibilidade Verdadeira
Caseína Controle	93,1±0,7 ^a	94,5±0,8 ^a
CSS*	93,2±0,9 ^a	94,6±0,9 ^a
FCSM**	72,1±5,7 ^b	74,3±5,8 ^b
FCSAM***	65,3±2,8 ^c	67,4±2,6 ^c
FCCAM****	65,0±3,6 ^c	67,2±3,8 ^c

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indica diferença estatística ($p < 0,05$).

*Caseína + sólidos solúveis.

**Feijão cozido sem maceração.

***Feijão cozido sem água de maceração.

****Feijão cozido com água de maceração.

Feijões crus da espécie *Phaseolus vulgaris* são tóxicos e somente podem ser consumidos quando apropriadamente cozidos; a proteína de feijão apresenta baixa digestibilidade se comparada à boa qualidade das proteínas de origem animal. De acordo com vários pesquisadores, a baixa digestibilidade de proteínas de feijão é uma das muitas causas de seu menor valor nutritivo. Estudos *in vitro* demonstraram que a

digestibilidade de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) situou-se entre 76,8 e 84,1%, apresentando-se diminuída quando a pigmentação do grão aumenta. Os pigmentos são, em geral, compostos fenólicos que podem interagir com proteínas do feijão, diminuindo sua digestibilidade e utilização (51). Os dados referentes à digestibilidade do feijão estão demonstrados na Tabela 5, onde observou-se que esta proteína apresenta menor digestibilidade, conforme literatura acima descrita. No entanto, verificou-se que os tratamentos diferiram entre si, conferindo maior digestibilidade ao feijão-comum cozido não macerado. Contudo, para este fato não se dispõe de explicação até o momento. A menor digestibilidade observada em dietas contendo feijão-comum, não pode ser explicada somente pela presença de fatores antinutricionais; os mecanismos ainda não são claros, mas interações proteína-taninos (52,53) aparentemente afetam a digestibilidade e disponibilidade de aminoácidos. Outros fatores, tais como as fibras que causam aumento na excreção de nitrogênio endógeno, devem ser também considerados.

Diante disso, salienta-se a necessidade de maiores informações do efeito destes fatores antinutricionais em diferentes fontes proteicas e contendo diferentes concentrações dos mesmos, visando traçar-se um perfil comprometedor para o aproveitamento de nutrientes dietéticos. A questão sobre os riscos à saúde provocados por fatores antinutricionais, o desconhecimento dos níveis de tolerância, o grau de variação do risco individual e a influência de fatores ambientais sobre a habilidade de destoxificação do organismo, bem como os danos devidos à prolongada ingestão de fatores antinutricionais são muito difíceis de serem avaliados, porquanto existem controvérsias com relação à extrapolação dos resultados de sistemas experimentais para seres humanos que se alimentam com dietas complexas.

CONCLUSÃO

O processamento doméstico do feijão-comum incluindo maceração prévia à cocção com descarte da água de maceração não absorvida pelos grãos, ocasionou redução nos fatores antinutricionais fitatos (85%), taninos (88%), no teor de amido (26,8%) e nos fatores de flatulência rafinose (25%), estaquiose (24,5%) e verbascose (41,7%).

A adição dos sólidos solúveis encontrados na água de maceração à dieta de caseína não afetou o seu valor nutritivo (NPR e digestibilidade).

O tratamento FCSAM foi o mais efetivo na remoção dos fatores antinutricionais fitatos e taninos e nos fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose, embora a maceração prévia à cocção do feijão-comum não interferiu no seu valor nutritivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as bolsas de Mestrado de QUEIROZ, K.S. (Processo N° 98/04323-7) e de HELBIG, E. (Processo N° 98/04324-7), bem como ao apoio financeiro concedidos ao Projeto (Processo N° 1998/4325-0) pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP).

À Dra. Priscila Fratin Medina, do Instituto Agrônômico de Campinas pelo fornecimento do cultivar puro de feijão-comum. Ao Dr. Olavo Rusig, de M. Cassab Comércio e Indústria Ltda. pelo fornecimento da mistura vitamínica.

REFERÊNCIAS

- Knudsen IM. High-performance liquid determination of oligosaccharides in leguminous seeds. *J Sci Food Agric* 1986;37(6):560-6.
- Valenzuela MRC, Sgarbieri VC. Influence of various dry bean fractions, cv. Carioca 80, on diet efficiency and dietary protein utilization. *J Nutr Sci Vitaminol* 1990;36(2):141-51.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, 1996. v.56, p.3-53: produção vegetal.
- Khokhar S, Chauhan BM. Antinutritional factors in moth bean (*Vigna aconitifolia*): varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. *J Food Sci* 1986; 51(3):591-4.
- Zhou JR, Erdman JW. Breadmaking properties of composite flours of wheat and faba bean protein preparations. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35(6):495-508.
- Torre M, Rodríguez AR, Saura-Calixto F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991;1(1):1-22.
- Naczek M, Nichols T, Pink D, Sosulski F. Condensed tannins in canola hulls. *J Agric Food Chem* 1994;42(10):2196-2200.
- Kaur D, Kapoor AC. Nutrient composition and antinutritional factors of rice bean (*Vigna umbellata*). *Food Chem* 1992;43(22):119-24.
- Deshpande SS, Damodaran S. Food legumes: chemistry and technology. *Adv Cereal Sci Technol* 1990;10:147-241.
- Ida EI, Silva RSF, Rao CS. Oligosaccharides of soybeans: problems and solutions. *Arq Biol Technol* 1981;24(4):25-30.
- Sánchez-Mata M, Teruel-Peñuela M, Cámara-Hurtado M, Díez-Marqués C, Torija-Isasa ME. Determination of mono-, di-, and oligosaccharides in legumes by high-performance liquid chromatography using an amino-bonded silica column. *J Agric Food Chem* 1998;46(9):3648-52.
- Baldini VLS, Draetta IS, Yong KP. Purification and characterization of α -galactosidase from bean *Phaseolus vulgaris*. *J Food Sci* 1985; 50 (6):1766-7.
- Jacorzinski B. Der einfluss einer raffinose – diet und gekochter leguminosensamen auf einig prozesse im dickdarm der ratte. *Nahrung* 1987;31(10):971-80.
- Goycoolea F, Gonzalez de Mejia E, Barron JM, Valencia ME. Efecto de los tratamientos caseros en la preparacion de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris*, L) sobre o contenido de taninos y valor nutritivo de las proteinas. *Arch Latinoamer Nutr* 1990;40(2):263-74.
- Bressani R, Navarrete DA, Garcia Soto A, Elias LG. Culinary practices and consumption characteristics of common beans at the rural home level. *Arch Latinoamer Nutr* 1988;38(4):925-34.
- Castellanos JZ, Maldonado HG, Jimenez A, Mejía C, Ramos JJM, Gallegos JAA, Hoyos G, Salinas EL, Eguiarte DG, Pérez RS, Acuña JG, Villalobos JAM, Hernández PF, Cáceres B. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.) en México. *Arch Latinoamer Nutr* 1997;47(2):163-7.
- Barampama Z, Simard RE. Oligosaccharides, antinutritional factors and protein digestibility of dry beans as affected by processing. *J Food Sci* 1994;59(4):833-8.
- Barampama Z, Simard RE. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. *Plant Foods Hum Nutr* 1995; 48(4):349-65.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37(8):911-7.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12. ed., HORWITZ, W., ed., Washington D.C.: AOAC, 1975. p.927-8.
- Williams PC. The use of titanium dioxide as a catalyst from large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *J Sci Food Agric* 1973;24(6):343-8.
- Mossé J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds; a reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seeds protein content. *J Agric Food Chem* 1990;38(1):18-24.
- Pearson D. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos [laboratory techniques in food analysis]. Zaragoza: Acribia, 1976.
- Lees R. Manual de análisis de alimentos. Zaragoza: Acribia, 1979.
- Instituto de Tecnologia de Alimentos. Manual técnico de análises. Campinas: ITAL, 1987.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16. ed., CUNNIF, P., ed., Washington D.C.: AOAC, 1995.
- Latta M, Eskin M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem*. 1980;28(6):1313-15.
- Deshpande SS, Cheryan M, Salunke DK. Tannin analysis of food products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1986;24(4):401-49.
- Bergeret G. Curso de industrias agrícolas: técnica analítica. Revista AGROS, 1937; 7(129):99.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 11. ed., HORWITZ, W., ed., Washington D.C.: AOAC, 1970.
- Vidal-Valverde C, Frias J, Valverde S. Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. *J Am Diet Assoc* 1993;93(5):547-50.

32. Assumpção RMV, Morita T. Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação. São Paulo: Edgard Blucher, 1968.
33. Carvalho PRN. *Cromatografia líquida de alta eficiência aplicada à análise de alimentos: manual técnico*. Campinas: ITAL, 1993.
34. Frias J, Hedley CL, Price KR, Fenwick GR, Vidal-valverde C. Improved methods of oligosacchride analysis for genetic studies of legume seeds. *J Liquid Chromat* 1994; 17(11):2469-83.
35. Revilleza MJR, Mendonza EMT, Raymundo LC. Oligosaccharides in several philippine indigenous food legumes: determination, localization and removal. *Plant Foods Hum Nutr* 1990; 40(1):83-93.
36. Sosulki FW, Elkowicz L, Reichert RD. Oligosaccharides in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. *J Food Sci* 1982; 47(2):498-502.
37. Macrae R, Zand-Moghaddam A. The determination of the component oligosaccharides of lupinseeds by high pressure liquid chromatography. *J Sci Food Agric* 1978; 29(12):1083-6.
38. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JR. GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939-51.
39. Pellet PL, Young VR. Nutritional evaluation of protein foods. Tokyo: The United Nations University, 1980, 154p.
40. Guzmán-Maldonado H, Castellanos J, González de Mejía E. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Food Chem* 1996;55(4):333-5.
41. Chitra VU. Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods Hum Nutr* 1995;47(2):163-72.
42. Sharma A, Shegal S. Effect of domesting processing, and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean (*Vicia faba*). *Plant Foods Hum Nutr* 1992;42(2):127-33.
43. Mulyowidarso RK, Fleet GH, Buckle KA. Changes in the concentration of carbohydrates during the soaking of soybeans for tempe production. *Intern. J Food Sci Technol* 1991; 26(6):595-606.
44. Vidal-Valverde C, Frias J, Sotomayor C, Diaz-Pollan C, Fernandez M, Urbano G. Nutrients and antinutritional factors in faba beans as affected by processing. *Zeitung Lebensm Unters Forsch* 1998; 207(2):140-5.
45. Nwinuka NM, Abbey BW, Ayalogu EO. Effect of processing on flatus producing oligosaccharides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and the tropical african yam bean (*Sphenostylis sternocarpa*). *Plant Foods Hum Nutr* 1997;51(3):209-18.
46. Khalil AH, Mansour EH. The effect of cooking autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. *Food Chem* 1995;54(2):177-82.
47. Abdel-Gawad AS. Effect of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds. *Food Chem* 1993;46(1):25-31.
48. Sgarbieri VC. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris*, L). *World Rev Nutr Diet* 1989;60(46):132-98.
49. Kataria A, Chauhan BM, Punia D. Effect of domestic processing and cooking methods on the contents of carbohydrates of amphidiploids (black gram × mung bean). *Food Chem* 1990; 36(1):63-72.
50. Jood S, Mehta U, Singh R. Effect of processing on available carbohydrates in legumes. *J Agric Food Chem* 1986;34(3):417-20.
51. Aw TL, Swanson BG. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. *J Food Sci* 1985;50(1):67-71.
52. Khokhar S, Fenwick GR. Phytate content of indian foods and intakes by vegetarian indians of Hisar region, Haryana state. *J Agric Food Chem* 1994;42(11):2440-4.
53. Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res* 1982; 28: 1-91.

Recibido: 14-09-2000

Acepado: 04-04-2001

Actividad ureásica en productos de soja. Propuesta de un nuevo método

M.C. Olguin, M.I. Zingale, G.C. Revelant, M.E. Vignale

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. Suipacha. Argentina

RESUMEN. La evaluación de la actividad ureásica residual en productos de soja es habitualmente empleada como indicador de la eficacia del tratamiento de inhibición practicado. El propósito de este trabajo consistió en realizar una comparación entre el método propuesto por la AACC (22-90), basado en medir diferencias de pH y una técnica en la que se mide la actividad ureásica por su acción hidrolítica de la urea y posterior dosaje del amonio producido mediante la reacción de Berthelot. Se utilizaron los dos métodos para procesar 20 muestras de harina de porotos de soja sin tratar y con diferentes tratamientos térmicos de inactivación. El nuevo método correlaciona satisfactoriamente con el de la AACC, $r = 0,9416$, ($p < 0.0001$), asimismo, presenta mayor especificidad ya que mide la concentración del producto de la reacción y ofrece una respuesta más amplificada que el incremento de pH.

Palabras clave: Harinas de soja, antinutrientes, actividad ureásica.

SUMMARY. Ureasic activity in soy products. Proposal of a new method. The evaluation of residual ureasic activity in soy products is usually employed as an indicator of the efficiency of the inhibition treatments. The purpose of this study is to compare the AACC method (22-90), based on differences of pH, with an assay where ureasic activity is measured by its hidrolitic action on urea and quantification of the ammonium produced with Berthelot reaction. Twenty different samples of soy bean flour with and without thermal inactivation treatments were assessed with the two methods. The new method has a good correlation with that of the AACC - $r = 0,9416$ ($p < 0.0001$). It also presents a better specificity because it measures the concentration of the reaction product and shows a more amplified answer than the increase of pH.

Key words: Soybean flours, antinutrients, urease activity.

INTRODUCCION

Los porotos de soja y sus derivados tienen gran riqueza en proteínas de elevado valor biológico y razonable digestibilidad, que los convierten en una fuente nitrogenada de reemplazo con costo sustancialmente inferior a las proteínas de origen animal. Sin embargo, la presencia de compuestos químicos tales como inhibidores de tripsina y de quimotripsina, lectinas, taninos, fitatos y saponinas, denominados genéricamente antinutrientes o factores antinutricionales (1- 4) disminuyen la eficiencia nutricional de dietas de soja respecto a lo que se podría esperar si sólo se tuviera en cuenta su composición química. Estos antinutrientes, de naturaleza proteica y diferente termoestabilidad, son inactivados mediante tratamientos térmicos habituales durante el acondicionamiento de los productos de soja antes de su consumo. La temperatura, el tiempo de aplicación y las condiciones de humedad a las que se lleva a cabo el tratamiento deben ser rigurosamente controladas debido a que se corre el riesgo de ocasionar, en eventuales casos de temperaturas y tiempos anormalmente elevados disminución de la biodisponibilidad de aminoácidos esenciales como la lisina, con defectos nutricionales de gravedad variable. La determinación del crecimiento en

animales de laboratorio, especialmente en ratas al destete, constituye el indicador más realista de la calidad nutricional de productos de soja (5,6). Sin embargo esta metodología es poco factible de ser llevada a cabo a nivel industrial, por lo que debe ser reemplazada por pruebas más sencillas y rápidas. Entre ellas se destacan la solubilidad proteica (7) y la actividad ureásica.

La actividad ureásica presente en los porotos de soja crudos disminuye notoriamente después de los tratamientos térmicos, y su evaluación es habitualmente empleada como indicador de la eficacia del tratamiento de inhibición practicado.

El propósito de este trabajo consistió en realizar una comparación entre el método propuesto por la AACC (22-90) -modificación del de Caskey-Knapp (8)-, con una técnica en la que se mide la actividad ureásica por su acción hidrolítica de la urea y posterior dosaje del amonio producido, mediante la reacción de Berthelot (9).

MATERIAL Y METODOS

Productos de soja

Las muestras de porotos de soja provenían de cultivos de la zona sur de la provincia de Santa Fe. Las harinas de soja

las proveyeron Galpro SA (San Lorenzo, provincia de Santa Fe), Alpro SA (Pergamino, provincia de Buenos Aires) y Extender S.A. (Provincia de Buenos Aires). Las provistas por Alpro presentaban información sobre los tratamientos de inactivación a que fueron sometidas.

Tratamiento de las muestras

Porotos crudos: se emplearon molidos, tanto con el contenido original de aceite como desgrasados (dos muestras) por medio de extracción con hexano normal en frío.

Porotos tratados: muestras de 250 g de porotos crudos fueron sometidas a tratamientos en el laboratorio. Estos consistieron en: (a) Remojo en agua destilada durante dos horas y hervor en agua destilada en recipiente de vidrio abierto durante 5, 10, 20 y 45 minutos, molienda y secado a 37 °C con corriente de aire. (b) Autoclavado: 5 minutos a vapor fluente; 5, 10 y 15 minutos a 1 atmósfera, molienda y secado a 37 °C (c) Aire seco a 100 °C, molienda.

Harinas comerciales: Galpro (Harinas G): inactivadas industrialmente, enteras y desgrasadas. Alpro (Harinas A): desgrasada con vapor de agua; tratada 2 minutos a 152 °C calor seco; aire seco a 140 °C; vapor 15 minutos a 1 atmósfera; vapor 5 minutos a 5 atmósferas. Extender: desgrasada, inactivada industrialmente.

Preparación de los extractos

Las muestras de porotos molidos y de harinas de soja tratadas con distintas metodologías se utilizaron para preparar extractos según la metodología descrita por Liener para la determinación de la actividad hemaglutinante de productos de soja (10). Se incubaron 5g de productos de soja con 25 ml de NaCl 0.9% estéril durante 1 hora entre 4-8°C y centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm. Los extractos obtenidos se emplearon para evaluar la actividad ureásica mediante el nuevo método.

Descripción de la metodología

Método de referencia: AACC Método 22-90 (Método de Caskey- Knapp modificado): medida de la diferencia de pH registrada entre 200 mg de una muestra de productos de soja en 10 ml de buffer de fosfatos 0.05 M de pH 7.0 conteniendo 3g% de urea y 200 mg de la misma muestra en 10 ml de buffer sin urea luego de la incubación durante 30 minutos a 30° C.

Nuevo método:

Reactivos: (a) Sustrato:Urea 0.01M

(b) Reactivos de Color: (I) Fenol 532mmol/l; Nitroprusiato de Na 0.85 mmol/l; etilén bis ditiocarbamato manganeso 0.3 mmol/l

(II) NaClO 36,6 mmol/l; p-toluén sulfoncloramida 0,12 mmol/l; NaOH 0.625 mmol/l

Técnica: 20 ul de extracto se emplean como reactivo

enzimático incubándose con 20 ul de sustrato durante 5 minutos a 37 °C. Se agregan 0.5 ml de Reactivo I y 0,5 ml de Reactivo II. Se incuba 5 minutos y se diluye con 8 ml de H2O destilada. Se efectúa la lectura espectrofotométrica a 540 nm. Los valores de la lectura se corrigen teniendo en cuenta la cantidad de harina que representa el volumen de extracto y refiriéndola a 200 mg, cantidad de muestra empleada en el método de referencia.

La actividad ureásica, que se cuantifica por medio de la concentración de amonio producido, se compara con la actividad desarrollada por un extracto de soja comercial provista por laboratorios Wiener a la que se le asigna 100% de actividad.

Evaluación del límite de detección y la sensibilidad del método propuesto

Para evaluar el límite de detección y la sensibilidad del método propuesto así como la posibilidad de diferenciar entre muestras con y sin actividad ureásica residual se efectuaron diluciones de la ureasa comercial provista por Wiener laboratorios con solución fisiológica y se usaron 20 ul de las mismas reemplazando a las muestras en el caso de la reacción de la AACC y en reemplazo de los extractos en el caso de la técnica propuesta.

Evaluación de la actividad ureásica en muestras de productos de soja

La actividad ureásica residual de 20 muestras de porotos y harinas de soja sometidas a diferentes tratamientos fue evaluada mediante las dos técnicas. En el caso de la técnica propuesta se expresó la actividad ureásica de las diferentes muestras como porcentaje respecto de la actividad de la ureasa comercial sin diluir a la que se le atribuyó 100% de actividad.

Los valores de actividad residual expresan la eficacia de los distintos tratamientos, que según varios autores (11,12) se relacionan con la humedad, tiempo y temperatura a que se llevan a cabo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la aplicación de correlación lineal con análisis de la linealidad. Se utilizó el programa estadístico Instat.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos en el experimento de evaluación del límite de detección y de la sensibilidad para detectar actividad de ureasa por medio del nuevo método. Se verifica que hasta una dilución 1/10 de la enzima comercial se mantiene un nivel de respuesta similar al de la original. El límite de detección del método propuesto alcanza hasta niveles de 0.004 partes de ureasa, nivel en el

que el método basado en la determinación de diferencia de pH no acusa respuesta y que por lo tanto resultaría en informar esa muestra como sin actividad ureásica residual. La sensibilidad del método propuesto evaluada como respuesta en densidad óptica de una parte de ureasa medida en base a su actividad, considerando la zona de la linealidad de la curva - entre 0.005 y 0.04 partes de ureasa-, es de 0.0036 unidades de densidad óptica para 0.001 partes de ureasa.

TABLA 1
Evaluación del límite de detección y la sensibilidad del método propuesto para detectar actividad enzimática de ureasa

Dilución Ureasa comercial	D.O. a 540 Nuevo método	% Actividad	Diferencia de pH Método AACC
1/250	0.027	10.6	0.00
1/200	0.023	9.0	0.00
1/100	0.041	16.1	0.00
1/50	0.093	36.6	0.00
1/25	0.150	59.0	0.03
1/10	0.241	94.0	0.06
1/5	0.245	96.4	0.07
1/2	0.29	116.5	0.09
Pura	0.254	100.0	0.14

En la Tabla 2 se detallan los valores de actividad ureásica residual obtenidos en diferentes muestras de productos de soja sometidas a diferentes tratamientos cuantificados por medio del método propuesto y del de la AACC. Los datos son un promedio de tres o cuatro determinaciones y se expresan como promedio y error estándar del promedio. Los resultados obtenidos permiten visualizar la relación inversa entre la temperatura, la humedad y el tiempo de tratamiento con los niveles de actividad ureásica residual. Así se puede observar que los tratamientos con calor húmedo ocasionan mayor inactivación y que el remojo previo al hervor en recipiente abierto resulta más efectivo que el tratamiento con vapor fluyente sin remojo previo. Estos hallazgos coinciden con lo observado por Kabara y otros (13). También resulta interesante el hecho de que el tratamiento con aire a 100° C no produce disminución de la actividad ureásica comparada con la que presentaron los protos sin tratar.

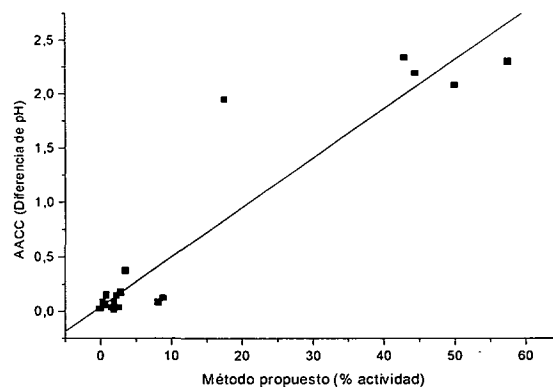
Los resultados de actividad ureásica residual obtenidos por los dos métodos fueron analizados estadísticamente y se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9416 ($p < 0.0001$), Test de Pearson. Empleando el test de Spearman se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.7957 ($p < 0.0001$). Los valores de error estándar del promedio de los replicados para las distintas muestras se muestran en la Tabla 2. Para los cálculos se empleó el programa estadístico Instat.

TABLA 2
Medida de la actividad ureásica residual por ambos métodos en muestras de productos de soja con diferentes tratamientos de inactivación

Muestra	n	Tratamiento	% Actividad Nuevo método	Diferencia de pH Método AACC
1	3	Por. Crudos desg	44.5 ± 0.983	2.19 ± 0.017
2	3	Por. Crudos enteros	57.5 ± 0.825	2.30 ± 0.057
3	3	Por. crudos desg	42.9 ± 1.126	2.34 ± 0.029
4	4	Por. Ent. Herv. 5 min sec 37°	3.6 ± 0.253	0.37 ± 0.016
5	3	Por. Herv. 10 min sec 37°	8.2 ± 0.404	0.80 ± 0.007
6	3	Por. hervidos 20 min	0.4 ± 0.056	0.08 ± 0.006
7	3	Por. hervidos 45 min	0.0 ± 0.000	0.02 ± 0.007
8	4	Por. Ent. Vap. Fl. 5 min	17.5 ± 0.793	1.95 ± 0.075
9	4	Por. Ent. 1 atm 5 min	1.9 ± 0.104	0.01 ± 0.004
10	3	Por. Ent. 1 atm 10 min	2.3 ± 0.173	0.14 ± 0.011
11	4	Por. Ent. 1 atm 15 min	0.0 ± 0.000	0.08 ± 0.006
12	4	Por. Ent. aire 100° C	50.0 ± 1.684	2.08 ± 0.043
13	4	Harina G. desg. inac.	8.9 ± 0.455	0.12 ± 0.006
14	4	Harina G. Inac.	0.9 ± 0.009	0.15 ± 0.009
15	4	Harina A. desg. con vapor	1.6 ± 0.085	0.03 ± 0.004
16	3	Harina A aire seco 140° C	1.9 ± 0.153	0.09 ± 0.009
17	4	Harina A. 2 min 152° C	2.9 ± 0.111	0.17 ± 0.011
18	3	Harina A 15 min 1 atm	1.8 ± 0.088	0.03 ± 0.006
19	4	Harina A. vapor 5 atm	0.6 ± 0.071	0.06 ± 0.006
20	3	Harina Extender desg.	2.5 ± 0.153	0.03 ± 0.009

Los resultados se expresan como promedio y error estándar de la media

FIGURA 1
Correlación entre la actividad ureásica evaluada por el método de la AA-CC y el método propuesto



Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el límite de detección del método propuesto alcanza hasta niveles de 0.004 partes de ureasa, nivel en el que el método basado en la determinación de diferencia de pH no acusa respuesta. La sensibilidad del método propuesto permite diferenciar satisfactoriamente muestras con actividades

residuales correspondientes a diferencias en 0.001 partes de ureasa. La correlación obtenida entre el método de la AACC 22- 90 y el propuesto es altamente significativa. La precisión alcanzada en la metodología propuesta resulta satisfactoria como se aprecia en los valores obtenidos para error estándar. Asimismo, el nuevo método presenta mayor especificidad, ya que se mide la concentración del producto de la reacción. Las respuestas cuantificadas en forma de actividad enzimática resultan más amplificadas que las expresadas como diferencia de pH (Tabla 1).

AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración recibida de parte de Wiener Laboratorios S.A.I.C. Riobamba 2944, Rosario, Argentina, consistente en la provisión de reactivos.

REFERENCIAS

- Lalles JP. Nutritional and antinutritional aspects of soyabean and field pea proteins used in veal calf production: a review. *Livest Prod Sci.* 1993; 34: 181-202,
- Birk Y. Protein proteinase inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. In: J. Huisman, T.F.B. van der Poel and I.E. Liener, editors. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*, Pudoc, Wageningen, 1989, p. 83-94.
- Huisman J. Antinutritional factors (ANFs) in the nutrition of monogastric farm animals. In: E.J. Weerden and J. Huisman, editors. *Nutrition and Digestive Physiology in Monogastric Farm Animals*, Pudoc, Wageningen, 1989, p.17-35.
- Liener IE. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. In: J. Huisman, T.F.B. van der Poel and I.E. Liener, editors. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*, Pudoc, Wageningen, 1991, p.6-14.
- Grant G. Antinutritional effects os soybean: a review. *Prog Food Nutr Sci* 1989; 13:209-214.
- Olguin M.C., Hisano N. D'Ottavio A.E., Zingale M.I., Gayol M.C., Revelant G. et al Alteraciones intestinales y disminución del crecimiento en ratas prepúberes alimentadas con soja. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59:747-752
- Araba M & Dale NM. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing of soybean meal, *Poultry Science* 1990, 69: 76-83.
- Caskey CD, Knapp F, Method for determining inadequately heated soybean meal. *Ind Eng Chem.* 1944, 16: 640-641.
- Henry RJ, Cannon D.C. and Winlselman J.W. *Clinical Chemistry Principles and Techniques* Ed.2 Harper and Row Publishers, Inc. New York, 1974: 504-506.
- Liener IE & Hill EG. The effect of heat treatment on the nutritive value and hemagglutinating activity of soybean oil meal. *J Nutr.* 1953, 99:609-620)
- Qin GX, Verstegen MWA, Van der Poel AFB. Effect of temperature and time during Steam Treatment on the Protein Quality of Full fat Soybeans from different origins. *J. Sci. Food Agric* 1998; 77, 393-398
- Anderson RL. Effects of Steaming on Soybean proteins and Trypsin Inhibitors, *JAACS* , 1992, Vol 69, (12)1170-1176
- Kabbara SAR, Abbas IR, Scheerens JC, Tinsley AM, Berry JW. Soaking and cooking parameters of tepary beans: effect of cooking time and cooking temperature on hardness and activity of nutritional antagonists. *Plant Food Human Nutr.* 1987, 37:151-159.

Recibido: 01-12-2000

Aceptado: 19-06-2001

Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark

Elizabeth Lemos Chicourel, Alice M. Sakuma, Odair Zenebon, Alfredo Tenuta-Filho

Universidade de São Paulo - FCF USP. Brazil

SUMMARY. Shark and other carnivorous fishes present high potential risk of excessive contamination by mercury. The distribution of mercury throughout the body of blue shark - *Prionace glauca* - was analysed, and the effects on mercury levels by frying and baking in a laboratory oven, and in a microwave oven, were measured. There was no significant statistical difference in mercury levels in the samples taken from regions near the head, or from central and tail parts, indicating homogeneous distribution of the metal in muscles throughout the body. Frying and baking did not affect original mercury levels present in blue shark. This study indicates that specific studies are needed to define the efficacy or inefficacy of the cooking methods on mercury reduction from fish, in order to clearly resolve divergent opinions in the literature.

Key words: Shark, fish, mercury, frying, baking, cooking.

RESUMEN. Ineficiencia de la fritura y el asado en la reducción de mercurio en tiburón. Los tiburones y otros peces carnívoros presentan alto potencial de riesgo por la excesiva contaminación con mercurio. La distribución de mercurio a través del cuerpo del tiburón azul - *Prionace glauca* - fue analizada, y medido los niveles de reducción de mercurio por el efecto de la fritura y el asado en horno de laboratorio y en horno de microondas. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de mercurio en las muestras tomadas de la región próxima a la cabeza, región central y región próxima a la cola, indicando una distribución homogénea del metal en el músculo a través del cuerpo. La fritura y el asado no afectaron los niveles de mercurio presentes en el tiburón azul. Estudios específicos son necesarios para definir la eficiencia o ineficiencia de los métodos de fritura y asado en la reducción de mercurio del pescado, con el propósito de resolver definitivamente las opiniones divergentes de la literatura.

Palabras clave: Tiburón, pescado, mercurio, fritura, asado.

INTRODUCTION

Mercury occurs naturally in the Earth's crust, and can be highly biotoxic when its concentration in the environment and biota exceeds levels considered harmful for the ecosystem and consequently for human consumption (1).

Mercury can be found in the environment in several chemical forms with different toxicity potential. It can also be affected by microorganisms, through a process of methylation by which it becomes methylmercury, the chemical state that is most absorbed and accumulated by living organisms, especially in the aquatic biota. Methylmercury is the most toxic among mercury compounds (1,2).

The property of methylation induces biomagnification of mercury along the food chain, which means that the concentration at a given trophic level is elevated to the next highest. In consequence, animals that are found at the top of this food chain, such as carnivorous species of tuna, swordfish and shark - all present high potential risk of excessive contamination. Considering this characteristic, there is a high probability that toxic levels of mercury will reach humans through the fish (1,3).

Most published works on the presence of mercury in fish are based on concentrations *in natura* samples, there being

little concern regarding domestic and/or industrial treatments that the fish undergo before consumption. Considering the relatively high temperatures used in the different methods of preparation, and the volatile characteristic of methylmercury, such treatments might sometimes reduce the concentration of this compound. This question has been explored in a number of laboratories around the world (4-12), but there is considerable divergence of opinions as to the true status.

In this article the distribution of mercury in blue shark was studied. Also studied were the effects upon original levels of mercury of frying and baking in a laboratory oven, and baking in a microwave oven.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the samples

Commercial samples of blue shark - *Prionace glauca*, decapitated, eviscerated, and without dorsal, ventral and caudal fins, weighing 45.3 ± 2.3 kg and measuring 1.81 ± 0.20 m, were obtained at the *Companhia de Entrepósitos e Armazens Gerais* of the State of São Paulo (CEAGESP) in São Paulo, Brazil. In order to analyze the distribution of mercury in each animal, samples were comprised of three transverse slices, each collected from: (a) near the head, (b) the central area, and (c) the tail section. The samples were

ground, frozen (-25°C), and lyophilized, and the experimental half-slices were fried and baked. Frying was performed in an electric frying pan (Walita, Fritanella Plus model RI 6570) in commercial soybean oil, for 3.5 minutes, at 160±5°C. Baking was carried out in a laboratory oven (Fabbe-Primar model 219) for 45 minutes, at 170±5°C and in a microwave oven (National Jr. model) for 10 minutes at medium strength. At the end of each treatment, the internal temperature of the samples was immediately measured with a common thermometer. Internal temperatures of the samples at the end of frying, baking in laboratory oven and baking in microwave oven were 76.9±3.3°C, 87.9±3.7°C and 94.6±2.4°C, respectively. The experimental samples were ground, frozen (-25°C), and lyophilized following the experiments.

Analyses

The mercury in the lyophilized samples was measured in duplicate by atomic absorption spectrophotometer (13) as indicated in detail by Chicourel, Tenuta-Filho, Sakuma, Zenebon and Amorim (14). All the reagents were tested for the presence of mercury, and all glassware was decontaminated prior to the experiment by immersion for 48hrs in a 30% nitric acid solution and then rinsed with distilled deionized water.

The accuracy and precision of the mercury analyses were validated by analysing "NBS Research Material 50 - albacore tuna" with a certified value of 0.95±0.10µg Hg/g (15). Then ten repetitions in duplicate were made and a mean value of 1.01±0.02µg Hg/g was found.

Results were analyzed statistically ($p < 0.05$) by t-paired test and Kruskal-Wallis test (16).

RESULTS AND DISCUSSION

Distribution of mercury in blue shark

The tendency to accumulate excessive and dangerous concentrations of mercury in shark, such as the 4.9µg/g detected by Lyle (17) in *Sphyrna lewini*, or 4.7µg/g or 3.1µg/g detected by Morales-Aizpurúa, Tenuta-Filho, Sakuma and Zenebon (18) in *Sphyrna sp* and *Odontaspis sp*, respectively, make this marine animal a potentially toxic source of food. It should therefore only be consumed under toxicologically safe conditions.

Distribution of mercury in the shark was analyzed because of its importance under the aspects of monitoring, inspection, and control for consumption. Samples taken from three regions of the shark's body - near the head, the central region and near the tail - showed no discrepancy in mercury levels that could be considered statistically significant (Table 1). The results obtained therefore indicated homogeneous mercury distribution.

TABLE 1
Mercury (µg/g) distribution in blue shark's body (a)(b)

Samples	Near the head	Central region	Near the tail
1	0.61±0.04 ^a	0.55±0.02 ^a	0.59±0.04 ^a
2	1.29±0.03 ^b	1.27±0.08 ^b	1.25±0.12 ^b
3	1.67±0.22 ^c	1.56±0.09 ^c	1.65±0.06 ^c

(a) Wet basis; (b) Mean ± standard deviation. Differences among the same sample indicated by the same superscript letters (a,b,c) were not statistically significant ($p > 0.05$).

In order to clarify whether sampling of different edible muscle tissues of the same fish could affect the results, Bortoli, Gerotto, Marchiori, Palonta and Troncon (19) published an interlaboratory study on 28 fishes. Bortoli, Gerotto, Marchiori, Muntau and Rehnert (20) also produced another study involving 6 predatory fishes. Among them the swordfish *Xiphias gladius* (3 specimens) and the sharks *Squalus acanthias* (2 specimens) and *Lamna nasus* (1 specimen) were analyzed. Such as the results in Table 1 the head, central and tail portions of the fishes showed no significant differences among themselves in mercury concentrations. Watling, Watling, Stanton, Macclurb and Engelbrecht (21) arrived at the same conclusion in relation to the shark *Isurus oxyrinchus*. Mercury distribution studies in walleye indicated an even distribution throughout the fillet, thereby making it unnecessary to homogenize the entire fillet (12).

These results are important because they show that mercury levels can be analyzed in muscles from any region of the fish's body. Monitoring, inspection and control for consumption, mentioned above, are thus made easier, an important factor for large species. To quantify the mercury in blue shark (*Prionace glauca*), Chicourel, Tenuta-Filho, Sakuma, Zenebon and Amorim (14) and Morales-Aizpurúa, Tenuta-Filho, Sakuma and Zenebon (18) took individual samples from the central region of the fish's body. About 30% of the samples bought commercially were unsuitable for human consumption (>1.0µg Hg/g), according to the Brazilian legislation for predatory species (22).

Armbruster, Gutenmann and Lisk (9) considered that the distribution of mercury in the muscles of striped bass was homogenous when using one fillet as a control sample and analysing the effects of frying and baking on mercury. Other authors proceeded in a similar way with other species (6-8,12).

Effects of frying and baking on mercury in blue shark

Methylmercury is the compound that accounts for the highest presence of mercury in fish, and is sometimes the only form present (1). The possibility of reducing mercury

during frying and baking was studied, based on the volatility of methylmercury. For possible synergic effects NaCl and lemon juice were previously added to the sample.

The experiments performed, however, did not indicate that the original levels of mercury in blue shark had been reduced during frying in soybean oil, baking in the laboratory oven or baking in the microwave oven (Table 2).

TABLE 2
Mercury ($\mu\text{g/g}$) in raw and cooked blue shark (a)(b)

Cooking method	Samples	Raw shark	Cooked shark
Frying	1	7.22 \pm 0.22 ^a	6.91 \pm 0.12 ^a
	2	10.52 \pm 0.52 ^b	10.05 \pm 0.48 ^b
Baking in laboratory oven	3	3.18 \pm 0.16 ^c	3.21 \pm 0.15 ^c
	4	7.75 \pm 0.28 ^d	8.18 \pm 0.18 ^d
Baking in microwave oven	5	3.36 \pm 0.11 ^e	3.42 \pm 0.09 ^e
	6	8.50 \pm 0.41 ^f	8.79 \pm 0.27 ^f

(a) Dry basis; (b) Mean \pm standard deviation. Differences among the same sample indicated by same superscript letters (a,b,c,d,e,f) were not statistically significant ($p>0.05$).

As in the present experiment, some authors observed no reduction of mercury from frying or baking *Salmo gairdneri* (4), grouper, red snapper, Florida pompano and Spanish mackerel (8), striped bass (9), *Thunnus thynnus*, *Lamna nasus*, *Mustelus mustelus*, *Squalus fernandinus* and *Scyliorhinus canicula* (11) and walleye (12). No reduction of mercury was observed either when lemon juice was added to walleye filets before frying (12).

The conditions indicated by the above authors [Table 3; except for Moretti, Marini and Bortoli (11), that do not mentioned the temperature and time used] were not exactly the same as those in the present experiment, and the original levels of mercury present in the samples varied greatly, from as little as 0.002 $\mu\text{g Hg/g}$ (8) to as much as 1.82 $\mu\text{g Hg/g}$ (4).

Armbruster, Gutenmann and Lisk (9) explained the results obtained as being due to methylmercury's chemical stability under the conditions for frying (80°C/10 minutes), baking in a common stove (80°C/31-40 minutes) and baking in a microwave oven (75-90°C/5-10 minutes) (Table 3). The conditions applied to frying blue shark (160 \pm 5°C/3.5 minutes), baking it in a laboratory oven (170 \pm 5°C/45 minutes) were apparently more favorable than those used by the majority of the authors (Table 3), for eventual removing methylmercury by volatilization.

TABLE 3
Frying and baking conditions that do not promoted mercury reduction

Cooking Methods	Temperature (°C)/ Frequency/Strength	Time (min)	Authors
Frying	177	1.8-4.3	Gall, Otwell and Koburger (8)
	80	10	Armbruster, Gutenmann and Lisk (9)
	177	8-12	Morgan, Berry and Graves (12)
	120-150	20	Limaverde-Filho, Campos, Goes and
Pinto (23)	160 \pm 5	3.5	Present paper
Baking in common oven	177	9.4-24.3	Gall, Otwell and Koburger (8)
	80	31-40	Armbruster, Gutenmann and Lisk (9)
	170	30	Pearce, Brooks and Reeves (4)
	115	10	Pearce, Brooks and Reeves (4)
	177	15-25	Morgan, Berry and Graves (12)
Baking in microwave oven	170 \pm 5	45	Present paper
	2450MHz	0.8-1.8	Gall, Otwell and Koburger (8)
	75-90	5-10	Armbruster, Gutenmann and Lisk (9)
	Medium strenght	10	Present paper

Contrary to the results shown in Table 2, Legrand and Le Moan (5), Anand (6), Lipre (7), Hernández García, Martínez Para and Masoud (10) and Limaverde-Filho, Campos, Goes and Pinto (23) obtained reduction of up to 65.5% of the mercury.

Legrand and LeMoan (5) reported reductions of 14% to 38% by frying rousette, containing 4.90-6.89 $\mu\text{g Hg/g}$ (dry basis). Frying at 170°C for 1-2 minutes, used by the above authors, did not differ much from frying the blue shark (160 \pm 5°C/3.5 minutes, Table 3), and do not apparently

explain the different results obtained.

Anand (6) obtained reductions of between 11.4% and 43.7% from frying for 4-7 minutes (temperature not mentioned) of fillets of *Pampus argentius*, originally containing 0.011 to 0.034 µg Hg/g. The results of Lipre (7) were 26.5±2.4% and 17.6±6.2%, respectively, from frying and baking samples of fresh water species *Lucioperca lucioperca*, *Esox lucius*, *Perca fluviatilis*, and *Sprattus sprattus balticus*, originally containing < 2.5 µg Hg/g. The above author, however, failed to indicate the temperature and time used.

Anand (6) and Lipre (7) considered the solubility (in oil) and the volatility of methylmercury as the causes for the reduction in mercury levels. As mentioned above, Armbruster, Gutenmann and Lisk (9), when justifying their results, indicated the contrary, namely, that mercury remained stable under frying (80°C/10 minutes, Table 3).

Hernández García, Martínez Para and Masoud (10) reported removal of mercury from several species of fish containing between 0.19 and 0.70 µg Hg/g. The results were 23.7%, 31.6%, 41.5%, and 65.5%, respectively, from frying bonito, frying bonito followed by adding tomato, frying boqueron a la Milanese, and baking sardines. The authors suggested that the reduction in mercury was due to the temperature, the instability of the mercury when found in an environment containing organic acids from tomatoes, and dilution by the incorporation of other ingredients when fish was fried a la Milanese. The higher temperature was considered the cause in baking, due to the direct contact of the sample with the source of heat. The authors do not mention the temperatures and times used.

Limaverde-Filho, Campos, Goes and Pinto (23) studied the removal of mercury from fishes containing between 0.20 and 9.3 µg/g (dry matter) by cooking at 120-150°C/20 minutes. Frying wasn't effective in the case of the "traíra" - *Hoplias malabaricus* (Table 3), but was effective for the "pirañba" - *Brachyplatystoma sp* - removing 12.9% of the mercury. In relation to "corvina" - Scianidae Family - and "pirañba" the cooking method used - "muqueca" - promoted a mercury reduction of 20 and 29.1%, respectively.

No specific factors were found that would justify the results described in Table 2 as compared to those reported by Legrand and Le Moan (5), Anand (6), Lipre (7) Hernández García, Martínez Para and Masoud (10) and Limaverde-Filho, Campos, Goes and Pinto (23), who reduced mercury content between 11.4% and 65.5%. In general the absence of clearer descriptions which would allow reproduction of these experiments have made it difficult to come to more solid conclusions.

The results of the present paper and those from the literature indicate that further studies are needed. It is

important to consider the variability of the mercury concentration in fish, the relation between inorganic mercury and methylmercury, and also the inside temperature effectively used. The true efficiency, or inefficiency, of methods of preparing fish in reducing mercury content prior to consumption must be more clearly defined, in view of the conflicting information found in the literature.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank FAPESP and CNPq - Brazilian Research Agencies, for their financial help. We also thank Mrs. Isabel C.B. Alves, who typed the manuscript.

REFERENCES

1. World Health Organization-WHO. Methylmercury (Environmental Health Criteria, 101) Geneva. WHO, 1990.
2. Jensen S, Jernelov A. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature* 1969; 223:753-4.
3. Casadei E, Rodrigues PC. Mercury contamination levels in the sharks of the mozambican channel. *FAO Fish Rep* 1986; 329 (suppl.): 463-470.
4. Pearce ID, Brooks RR, Reeves RD. Digestion of fish samples for mercury determination by flameless atomic absorption spectrophotometry. *J Assoc Off Anal Chem* 1976; 59:655-57.
5. Legrand AM, Le Moan G. Influence de quelques traitements culinaires sur la teneur en mercure des poissons. *Ann Falsif Expert Chim* 1977;70:321-4.
6. Anand SJS. Mercury, arsenic and cadmium in the unfried and fried fish. *J Radioanal Chem* 1978;47:93-7.
7. Lipre E. Changes of mercury content by the technological treatment of fish. *Tallinna Politekh Inst Toim* 1980; 489:35-40.
8. Gall KL, Otwell WS, Koburger JA, Appledorf, H. Effects of four cooking methods on the proximate, mineral and fatty acid composition of fish fillets. *J Food Sci* 1983; 48:1068-74.
9. Armbruster G, Gutenmann WH, Lisk DJ. The effects of six methods of cooking on residues of mercury in striped bass. *Nutr Rep Int* 1988; 37:123-6.
10. Hernández García MT, Martínez Para MC, Masoud TA. Variación en la cantidad de mercurio en muestras de pescado sometidas a diversos procesos culinarios. *An Bromatol* 1988; 40:291-7.
11. Moretti G, Marini V, Bortoli A. Il mercurio e selenio nel pesce crudo e dopo cottura. *Riv Soc Ital Sci Alim* 1990;19:35-8.
12. Morgan JN, Berry MR, Graves R.L. Effects of commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessments. *J Exp Anal Environ Epidemiol* 1997; 7:119-133.
13. Association Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed. Washington, DC. AOAC, 1980.

14. Chicourel EL, Tenuta-Filho A, Sakuma AM, Zenebon O, Amorim AR. Mercúrio em pescado comercializado em São Paulo-SP, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment* 1995; 15:144-9.
15. Lafleur PD, Reed WP. National Bureau of Standards (NBS): Report of Investigation. Research Material 50. Albacore Tuna, Washington, 1977.
16. Bussab WO, Morettin PA. *Estatística básica*. São Paulo: Atual, 1985.
17. Lyle JM. Mercury concentrations in four carcharhinid and three hammerhead sharks from coastal waters of the Northern territory. *Aust J Mar Freshwater Res* 1984; 35:441-451.
18. Morales-Aizpurúa IC, Tenuta-Filho A, Sakuma AM, Zenebon O. Mercúrio total em cação comercializado em São Paulo-SP, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment* 1999;19:429-32.
19. Bortoli A, Gerotto M, Marchiori M, Palonta M, Troncon A. Analytical problems in mercury analysis of seafood. *Ann Ist Super Sanità* 1995; 31: 359-62.
20. Bortoli A, Gerotto M, Marchiori M, Muntau H, Rehnert A. Critical comparison of methods for mercury determination in fish. *Mikrochim Acta* 1995;119:305-10.
21. Watling RJ, Watling HR, Stanton RC, Mcclurb TP, Engelbrecht EM. The distribution and significance of toxic metals in sharks from the Natal Coast, South Africa. *Water Sci Technol* 1982; 14:21-30.
22. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria nº 685/98. *Diário Oficial*, Brasília, sec.1, pt. 1, p. 1415-1437, 24 Set 1998.
23. Limaverde-Filho AM, Campos RC de, Goes V de A, Pinto RAG. Avaliação da perda de mercúrio total em peixes antes e após os processos de fritura e cocção. *Ciênc Tecnol Aliment* 1999;19:19-22.

Recibido: 16-11-2000

Aceptado: 11-04-2001

Fortificacion y evaluacion de tortillas de nixtamal

*Juan de Dios Figueroa Cárdenas, María G. Acero Godínez, Nora L. Vasco Méndez,
Alejandro Lozano Guzmán, Luz M. Flores Acosta y Jesús González-Hernández*

CINVESTAV-IPN, Querétaro, Qro. México- Universidad de Colima y Universidad Autónoma de Aguascalientes. México

RESUMEN. Se evaluó el efecto de la adición de vitaminas y pasta de soya desgrasada sobre la calidad de la tortilla de nixtamal (TN), así como las pérdidas de algunos nutrientes durante el proceso de nixtamalización. La adición de vitaminas y pasta de soya desgrasada se fijaron en 0.15% y 4% respectivamente, puesto que valores superiores afectaron negativamente el color y sabor en el producto. Se observó que el maíz pierde aproximadamente 1.5% de proteínas durante su transformación a tortilla, mientras que la tortilla de nixtamal fortificada con 4% de soya desgrasada (TNS) presentó 3% más proteína que la TN. Los contenidos de calcio en las tortillas fueron de 7.7, 114 y 212.5 mg/100 g para el maíz, TN y para TNS respectivamente. Respecto a la pérdida de vitaminas durante la transformación de maíz a tortilla se cuantificó 29.0% de pérdida para niacina, 46.3% para ácido fólico, 36.4% para tiamina y 80% para riboflavina. Durante el lavado del nixtamal se pierden gran cantidad de vitaminas, se cuantificó una pérdida de 18.2% de tiamina, 16.6% de riboflavina y 20.7% de ácido fólico. Por el contrario la harina nixtamalizada integral, en cuyo proceso de elaboración no se contempla el lavado, presentó un balance de niacina positivo del 7.9%. Las pérdidas durante el cocimiento de la tortilla fueron muy elevadas especialmente para la riboflavina, ya que del 80 % de pérdidas de esta vitamina durante el proceso total, el 63.8 % se presentó durante su cocimiento y el 16.6% durante el lavado del nixtamal.

Palabras clave: Tortilla de nixtamal, fortificación, vitaminas, calidad de la tortilla.

SUMMARY. Fortification and evaluation of the nixtamal tortillas. The effect of the addition of vitamins and soy protein on the quality characteristics of nixtamal tortillas (TN) and the losses of nutrients during the nixtamalization process were evaluated. Vitamins (0.15% as is) and defatted soy (4% as is) were added to the tortillas without affecting their sensory characteristics. Higher values of those nutrients had a negative effect on the color and flavor of the product. During the production of the tortilla the corn lost approximately 1.5% of proteins. The nixtamal tortilla fortified with 4% of defatted soy (TNS) showed 3% higher protein content than the TN. The calcium content in the samples was 7.7, 114 and 212.5 mg/100 g for the corn, the TN and the TNS respectively. In the process of producing the nixtamal tortillas from corn 28.9% of the niacin, 46.3% of the folic acid, 36.3% of the thiamin and 80% of the riboflavin were lost. During the washing and rinsing of the nixtamal there were losses of 18.2% of the thiamin, 16.6% of the riboflavin and 20.7% of the folic acid. Although the niacin showed a 28.9% loss, the alkaline process caused an important release of that vitamin. The losses during the cooking of the tortillas were high especially for riboflavin which showed a total loss of 80% in comparison with the original corn. Of the total, 63% was lost during cooking and 16.6% was lost during washing of the nixtamal.

Key words: Nixtamal tortilla, fortification, vitamins, tortilla quality.

INTRODUCCION

La fortificación de alimentos es el mejoramiento nutritivo de alimentos por medio del agregado de nutrientes, tales como vitaminas, minerales y aminoácidos (u otros suplementos proteínicos) (1). Las estrategias de la fortificación se basan en el potencial para beneficiar, en el menor tiempo, a la mayor parte de la población que padece desnutrición por medio del mejoramiento de la calidad del alimento o alimentos que componen la mayor parte de la dieta. En 1997 en México se estableció la adición de micronutrientes a las harinas de trigo y maíz para reponer las vitaminas y minerales perdidos durante la transformación de los granos en harina. Actualmente en el país se han implementando las medidas

para que las harinas refinadas sean enriquecidas con tiamina (5 mg), riboflavina (3.0 mg), niacina (35 mg), ácido fólico (2.0 mg), hierro (30 mg) y zinc (20 mg)/kg. El costo de la adición de estos seis nutrientes básicos representa aproximadamente 1.6% del precio de la tortilla por lo que se espera no incremente el costo del producto. La industria harinera nacional está llevando a cabo varios programas para la fortificación de la tortilla hecha de harina nixtamalizada. En este aspecto se espera enriquecer la tortilla elaborada de harina que representa el 22.8% del consumo total en México, sin embargo no se ha contemplado el 36.7% de la tortilla que se elabora con masa de molinos de nixtamal comerciales, ni el 40.5% de la tortilla elaborada a mano en zonas rurales (2). Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue evaluar

tecnologías sencillas y de bajo costo para fortificar con vitaminas, minerales y proteínas la tortilla de nixtamal.

La tortilla en la dieta

En México la tortilla forma parte de la dieta de todos los estratos sociales, con un consumo per cápita de 120 kg anuales, esto es 328 g/día de tortilla. La tortilla sola provee 38.8% de las proteínas, 45.2% de las calorías y 49.1% del calcio de la dieta diaria de la población de México y en zonas rurales provee aproximadamente el 70% del total de calorías y el 50% de las proteínas ingeridas diariamente (3). En términos de porcentaje en peso del alimento la tortilla aporta el 65% y el frijol aporta el 15% de la dieta rural (4). Esto aunque muy crítico, es algo afortunado por la combinación del frijol con el maíz que permite la sobrevivencia en esas comunidades. Datos semejantes fueron presentados por Elías y Bressani (5) sobre la dieta de niños de Guatemala que indican cifras de 72% y 8% de maíz y frijol, respectivamente.

El maíz, como todos los cereales, es deficiente en los aminoácidos esenciales lisina y triptofano, y también en niacina, vitamina del complejo B que previene la pelagra y que es sintetizada a partir del triptofano. La nixtamalización implica un tratamiento selectivo de las proteínas del maíz e incrementa el balance de aminoácidos esenciales y libera niacina que de otra manera permanecería sin ser aprovechada. Asimismo, el proceso de nixtamalización provee beneficios como la alta disponibilidad de calcio en la tortilla que es importante porque evita el desarrollo de osteoporosis (6- 8).

La problemática de la producción de tortilla se ha venido incrementando en México, ya que actualmente se consumen 10 millones de toneladas de tortillas al año. La falta de una dieta apropiada, debido a la limitación de recursos económicos y al incremento de la población, han hecho que la población sea más dependiente de la tortilla para su alimentación diaria. Es un hecho que el consumo de tortilla en zonas rurales se incrementa considerablemente en épocas de crisis económicas.

Investigaciones y estrategias de fortificación de la tortilla

Las primeras investigaciones sobre la tortilla en México se efectuaron en los años 50's por el Instituto Nacional de Nutrición (9). Posteriormente, se estudió la fortificación de la tortilla con harina de soya, garbanzo etc. (9-11). El Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) con sede en Guatemala también ha estado a la vanguardia en lo relacionado al mejoramiento del valor nutritivo de la tortilla, llevando a cabo la suplementación de la harina instantánea de maíz con sus aminoácidos limitantes (12). Se ha encontrado que la adición de aminoácidos limitantes (lisina y triptofano) mejora el valor nutritivo de las proteínas de la tortilla. Sin embargo, se obtiene un aumento mayor cuando la harina de maíz esta fortificada simultáneamente con aminoácidos y

vitaminas tales como tiamina, riboflavina y niacina (13). Otros investigadores han intentado enriquecer la tortilla, usando proteína de pescado, harina de soya, etc. (14,15). En algunos casos se han registrado avances importantes, en otros se ha alterado el sabor, color o bien el producto se endurece con rapidez (2,15).

En el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) se están mejorando los maíces con altos niveles de lisina y triptofano, gracias al gene Opaco-2 (O_2). Actualmente hay maíces QPM (Quality Protein Maize) que tienen el gene O_2 modificado para producir endospermo cristalino, duro y así dar un mayor rendimiento en el proceso (16). Por otra parte en el CINVESTAV se han llevado a cabo estudios de los cambios químicos en el contenido de vitaminas y otros nutrientes del maíz que se pierden en la transformación de maíz a tortilla. Gómez et al (17) indicaron que las pérdidas de alrededor del 50% en tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico fueron significativas durante el proceso de la producción de la tortilla. En este estudio la meta fue restablecer los niveles de algunos nutrientes perdidos en la transformación del maíz a tortilla, por medio de tecnologías de fortificación sencillas y de bajo costo sin perder los atributos de calidad de la tortilla de nixtamal.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó maíz comercial para la preparación de las tortillas que fueron elaboradas por el proceso tradicional (18). A 10 kg de maíz se le adicionaron 20 litros de agua y 1% de cal [$Ca(OH)_2$], se colocaron en el fuego a ebullición por 20 minutos y posteriormente se dejaron en reposo por 14 hr. El nixtamal obtenido se lavó cuatro veces con agua y se escurrió para proceder a la molienda con molino de piedras. En la etapa de molienda del nixtamal se agregó en seco 0.15% de la premezcla de vitaminas y/o 4% (base húmeda) de la pasta de soya desgrasada y cocida. El nixtamal generalmente tiene una humedad de 42% a 45% y la pasta 9.6% por tanto la pasta de soya agregada puede variar 6.2 a 6.5% (base seca). Cabe mencionar que dichos porcentajes fueron fijados en base a ensayos preliminares que no se describen en esta publicación. La pasta de soya se homogeneizó con el nixtamal con una pala o bien con la masa en las mezcladoras comerciales donde se acondiciona agua quedando la humedad final de la masa de 52.9% a 56.3% para cocer la tortilla.

Premezcla de vitaminas y minerales

Mononitrato de tiamina 53.920 g; Riboflavina 33.330 g; Nicotinamida 383.850 g; Acido fólico 6.165 g; Hierro reducido 321.430 g; Oxido de zinc 130.760 g; Maltodextrinas c.b.p. 1000.000 g. Esta premezcla se adicionó al 0.15 % en peso del nixtamal (base húmeda).

Pasta de soya desgrasada

La pasta de soya se produce comercialmente calentando el grano de soya y haciendo hojuelas para extraer el aceite con el uso de hexano o solventes homólogos de hidrocarburos hasta menos del 1%. Las hojuelas extraídas se cuecen y muelen para formar una harina. La pasta de soya desgrasada y cocida presentó en base seca un contenido de 48.7% de proteínas, 0.96% de grasa, 9.6% de humedad y 3.85% de fibra cruda. El análisis de minerales en la pasta de soya fue de 0.017% de hierro, 0.002% de zinc y 0.351 % de calcio.

Reología de la masa

Las determinaciones de textura en la masa y de las tortillas se realizaron con el equipo Texture Analyzer (TA), modelo TA-XT2 (Texture Technologies Corp.), de 25 kg-f de capacidad con sensibilidad de 0.0001 kg. A la masa obtenida se le efectuaron estudios reológicos de consistencia, cohesión y adhesión. Se tomaron porciones de 25 g, que se moldearon con un anillo de plástico de 7.5 cm de diámetro y 1.9 cm de altura; la masa así moldeada se colocó en la plataforma de aluminio del Texture Analyzer y se hizo penetrar una esfera metálica de 1.27 cm de diámetro (TA-18, Texture Technologies Corp.), con una velocidad de penetración de 2 mm/s y con una distancia de 4 mm. Cada prueba se realizó con una repetición.

Preparación de los tratamientos

Los tratamientos probados fueron: Maíz crudo molido; TN= Tortilla de Nixtamal; TNV = Tortilla de Nixtamal con 0.15% (b.h.) de premezcla de vitaminas hidrosolubles y minerales; TNS = Tortilla de Nixtamal con 4% (b.h.) de harina de pasta de soya desgrasada y cocida; TNVS = Tortilla de Nixtamal con 0.15% de premezcla de vitaminas y 4% de pasta de soya desgrasada y cocida; TIS = Tortilla Integral preparada de acuerdo a la metodología de Gómez-Aldapa (15,16) + 4% de pasta de soya desgrasada y cocida.

Elaboración de tortillas

De cada muestra de masa se elaboraron tortillas de 12.5 cm de diámetro en una tortilladora manual de rodillos, previamente calibrados para obtener una abertura de 1.2 mm. Las tortillas fueron cocidas en un comal de acero a una temperatura de $280^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, por 30 segundos de un lado (para formar la capa delgada) y 25 segundos por el otro lado, finalmente se voltearon una vez más y se dejaron por un tiempo hasta lograr el inflado. Las tortillas se enfriaron a 27°C para que no se pegaran y se guardaron en bolsas de polietileno de baja densidad hasta su evaluación.

Análisis de la calidad de la tortilla

Pérdida de peso

Se efectuó por diferencia de peso de la tortilla cruda y cocida. Para lo cual se pesó la tortilla cruda con las dimensiones de grosor descritas anteriormente, se mantuvo la tortilla en un material aislante (polietileno de baja densidad) para evitar pérdida de peso hasta que le tocó el turno de su cocimiento. Se coció la tortilla con las condiciones previamente descritas del comal y se determinó por quintuplicado el porcentaje de pérdida de peso por diferencia cuando la tortilla tenía 40°C .

Inflado

Para evaluar el grado de inflado se hicieron cinco tortillas bajo las condiciones antes descritas, evaluando la formación de la ampolla durante el cocimiento de la tortilla. Dependiendo de la proporción de la ampolla que presentó la tortilla, se le asignó una calificación de acuerdo a la escala siguiente: 1=inflado al 100%, 2=inflado al 50% y 3=no hubo inflado. Tortillas con valores de «1» son las preferidas porque retienen más la humedad, tienen más suavidad y mejor textura.

Rolabilidad

Para determinar la rolabilidad de la tortilla se utilizó el método descrito por Bedolla (19), con algunas modificaciones. La prueba se llevó a cabo a temperatura ambiente después de 30 minutos de elaborada la tortilla. Se tomaron al azar tres tortillas completas, éstas se enrollaron en un tubo de 2 cm de diámetro y se observó si se presentó o no la ruptura. Se asignaron calificaciones dependiendo del grado de rompimiento que se presentó. Los extremos de la escala de calificación fueron 1= cuando no se rompió y 5= cuando hubo 100% de rompimiento al enrollamiento (como para formar un taco).

Color

Para evaluar el color de la tortilla se utilizó el MiniScan (Hunter Lab Reston Virginia USA). Tomando los valores de luminosidad «L» con escala de 0=negro a 100=blanco; los valores de rojo a verde «a», en la escala de rojo cuando es positivo, verde cuando es negativa y gris cuando es cero. Los valores de amarillo a azul «b», con escala que mide el color amarillo cuando es positiva, azul cuando es negativa y gris cuando es cero. Se evaluaron tres tortillas de cada tratamiento.

Olor y sabor

Con respecto al olor y sabor de las tortillas, se efectuaron análisis subjetivos para determinar olores y sabores indeseables no característicos de la tortilla.

Tensión

Esta prueba simula la fuerza al rasgado con las manos. Se eligieron al azar tres tortillas de cada tratamiento, a las que se les cortó la parte central utilizando un molde de lámina de forma de "i" mayúscula (I) cuyas dimensiones fueron, 8.6 cm de largo por 3.7 cm de ancho. El pedazo de tortilla con la forma establecida se sujetó con dos mordazas de tensión (TA-96) del texturómetro TA-XT2. Dicha prueba de rompimiento por tensión se efectuó con el texturómetro a una velocidad de 2mm/s y a una distancia de 10 mm. Se determinó la fuerza máxima de la tensión con dos repeticiones.

Corte

La prueba simula la fuerza del corte de un diente durante el masticado. Dicha prueba utiliza el accesorio TA-90 del texturómetro TA-TX2. Este accesorio es una cuchilla plana de 3mm de espesor y 69.3 mm de ancho que se conecta al brazo sensor del texturómetro y al desplazarse hacia abajo pasa a través de la ranura de una placa de aluminio ocasionando que el material expuesto se corte.

La prueba se realizó en las mitades intactas de las tortillas utilizadas en la prueba de tensión y sometiéndolas transversalmente al corte, a una velocidad de 2 mm/s y a una distancia de 15 mm. Las mediciones se hicieron en la primera hora y a las 24 h después de ser elaboradas. Cada prueba se realizó por duplicado.

Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de los tratamientos en tortilla se realizó de acuerdo a la metodología descrita por la AACC (20). Proteína por el método 46-26, empleando el factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6.25, Humedad por el método 44-19, Cenizas por el método 08-12, Extracto etéreo por el método 30-20 y Fibra cruda por el método 32-10.

Análisis de vitaminas hidrosolubles

Para el análisis de vitaminas (ácido nicotínico, niacina, tiamina, riboflavina y ácido fólico) las muestras se prepararon de acuerdo a la metodología descrita por Fellman et al (21) y se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de líquidos, siguiendo la técnica de Lam et al (22) con ligeras modificaciones que se detallan enseguida:

Estándares: Niacina, tiamina, riboflavina y ácido fólico (Sigma). Reactivos: trietilamina, grado HPLC Chromanorm, Heptan sulfonato de sodio (Regis Co.), ácido acético glacial (Baker), metanol grado HPLC (Baker), agua destilada y desionizada, ácido clorhídrico, acetato de sodio y ácido tricloroacético (Merck) y amiloglucosidasa (Sigma). Los estándares y la curva de calibración se prepararon como lo indica Lam et al (22).

Para la preparación de la muestra se utilizó la técnica descrita por Fellman et al (21) que no solo es aplicable a

tiamina y riboflavina sino también para el resto de las vitaminas hidrosolubles.

La determinación cromatográfica se efectuó por HPLC, de acuerdo a la técnica descrita por Lam et al (22). La fase móvil se preparó con 0.941 g de heptan sulfonato de sodio, 10 ml de ácido acético, 1 ml de trimetilamina en un litro de solución. De esa solución se tomaron 850 ml y se aforaron a 1 litro con alcohol metílico grado HPLC. El pH se ajustó a 3.6 y la fase se paso por una membrana de teflón de 0.22 y se sonicó durante 40 minutos.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos LDC-Analytical con detector de UV ajustando la longitud de onda a 250 nm para niacina y tiamina y 270 nm para ácido fólico y riboflavina y columnas C-8, 5 μ , 250x4.6mm. Se trabajó a temperatura ambiente con la fase móvil mencionada con un flujo de 0.7ml/min. Se inyectaron 20 μ l de estándar o muestra. Se efectuaron 5 determinaciones de cada muestra o tratamiento.

Análisis de minerales (Ca, y P) por espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP)

Las muestras previamente calcinadas se pesaron en vasos de precipitado, adicionando 20 ml de HCL 1:1. Las muestras se mantuvieron en calentamiento y agitación en placas de agitación con control de temperatura hasta su completa solubilización. Se agregó agua destilada según se requirió para su solubilización. Se transfirieron estas soluciones a matraces volumétricos de 200 ml aforando con agua destilada. Una vez preparadas las muestras se procedieron a inyectarlas al espectrómetro de emisión atómica de plasma (ICP) marca Spectro modelo Flame, la cual fue inyectada a través de un tubo capilar de flujo gaseoso que forma el plasma con gas Argón UAP (ultra alta pureza). Con la utilización de estándares de Ca y P marca Alfa se determinó de manera directa la concentración de los minerales en la muestra.

Determinación de hierro y zinc por absorción atómica

La preparación de la muestra fue igual a la descrita anteriormente para el método de emisión atómica por plasma (ICP). La muestra en solución es aspirada por medio de un quemador de aire-acetileno en el que se hace incidir un haz de energía radiante con la longitud de onda del Zn ($\lambda = 213.9$ nm) y para el Fe ($\lambda = 248.3$ nm). Se utilizó un Espectrómetro de Absorción Atómica marca Perkin-Elmer modelo 2380, en el cual la energía radiante absorbida se relaciona con la concentración de patrones de Zn y Fe marca Alfa de concentración conocida.

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de rango múltiple de Duncan para la comparación de medias de las diferentes variables de respuesta obtenidas, utilizando el programa Statistical Analysis System (23).

RESULTADOS Y DISCUSION

Calidad de la tortilla fortificada

Este trabajo evaluó cuatro formas de fortificación para el mejoramiento nutricional de la tortilla con diferentes micronutrientes y proteínas, entre las cuales se encuentran: a) el uso de micronutrientes (vitaminas y minerales) adicionados al nixtamal, b) la adición de pasta de soya integral para aprovechar los niveles de lisina, triptofano, vitaminas y minerales naturalmente presentes en la soya integral, c) el uso de nuevos métodos de nixtamalización que favorecen el aprovechamiento integral del grano de maíz (2,18), y d) la combinación de todos los puntos anteriores. Ensayos preliminares no incluidos en esta publicación, ayudaron a fijar los niveles probados de la premezcla de vitaminas y pasta de soya, que fueron adicionados de tal forma que no se viera afectada la calidad sensorial de la tortilla (color, sabor, aroma y vida de anaquel). En la Tabla 1 se muestran las características reológicas de las masas y la textura de las tortillas fortificadas. Se puede observar que la adición de 4% y 6% de soya incrementó la cohesión de la masa pero no afectó la adhesión. Esto es la soya incrementó el aglomeramiento de las partículas en la masa pero ésta no se hizo pegajosa. Por otra parte la textura al corte o al masticado de la tortilla se afectó favorablemente con la adición de soya y vitaminas, ya que estas tortillas presentaron mayor suavidad. La adición de las

vitaminas y minerales así como también la soya en la tortilla fortificada, disminuyeron la resistencia mecánica al corte. El rendimiento de la masa se incrementó de 2.10 kg/kg de maíz en TN a 2.13 para TNS con 4% de pasta de soya incrementando también el rendimiento de tortilla de 1.76 Kg de tortilla/Kg de maíz en TN hasta 1.82 en TNS con 4 % de pasta. Varios investigadores han encontrado resultados similares con tortillas fortificadas con diferentes porcentajes de soya (24-27). Collins y Sánchez (24) encontraron que la absorción de agua con niveles del 10% y 20% de soya fue mayor que la del maíz y la masa desarrollo mejor consistencia la cual incrementó la cohesión de la masa. La soya en la tortilla fortificada disminuyó la firmeza (dureza) de la tortilla y aumentó la flexibilidad o rolabilidad de la tortilla debido a la mayor cantidad de agua presente en el producto. Por su parte Rooney (26) mostró que las tortillas fortificadas con 5% de soya desgrasada aumentaron la absorción de humedad de la masa y en general produjeron tortillas con mayor contenido de humedad. El mismo autor (26) estableció que la adición de pasta de soya desgrasada produjo tortillas más suaves, con mejor rolabilidad, color y calidad lo que refuerza los datos encontrados en el presente trabajo. Green et al (28) indicó que tortillas fortificadas con soya sin desgrasar al 12% presentaron colores similares a los de la tortilla control y valores mayores del 12% producen un color oscuro del producto.

TABLA 1
Características de textura en los diferentes tratamientos de fortificación de la tortilla con premezcla de vitaminas y soya desgrasada¹

Tratamiento	Masa		Tensión (N)	Tortilla	
	Cohesión (N)	Adhesión (N)		Corte (día 1) (N)	Corte (día 2) (N)
TN (Control)	2.57 ± 0.10 b	-0.301 ± 0.01a	4.62 ± 0.20 a	22.69 ± 2.04 a	27.16 ± 2.32 a
TN+0.1% Vitaminas	2.61 ± 0.06 b	-0.33 ± 0.02 a	3.51 ± 0.13 b	13.07 ± 0.05 b	16.63 ± 0.09 b
TN+0.15% Vitaminas	2.43 ± 0.02 b	-0.28 ± 0.03 a	2.69 ± 0.11c	14.02 ± 1.41b	13.94 ± 1.40 c
TN+4% soya	2.88 ± 0.09 a	-0.25 ± 0.05 a	3.52 ± 0.29 b	12.79 ± 0.84 b	17.24 ± 0.42 b
TN+6% soya	2.89 ± 0.11a	-0.24 ± 0.07 a	2.48 ± 0.14 c	8.93 ± 1.04 c	13.77 ± 0.97 c

TN=Tortilla de nixtamal, N=Newton.

¹ Medias ± desviación estándar seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P<0.05).

En la Tabla 2 se hace una comparación de algunas características de calidad de las diferentes tortillas. Se puede observar que con la adición de vitaminas en niveles superiores de 0.15% (base húmeda) se empiezan a detectar sabores, colores y olores desagradables a vitaminas por lo que el máximo nivel aceptable para trabajar en los tratamientos se fijó en 0.15% de la premezcla mencionada. Por otra parte, el uso de la soya desgrasada se fijó en 4% (base húmeda) puesto que valores superiores incrementaron el color en el producto.

Una vez determinado los niveles de adición de la

premezcla y de la pasta de soya, se evaluaron las pérdidas de micronutrientes durante la transformación de maíz a tortilla y el porcentaje de pérdidas de micronutrientes y proteínas después de su adición.

Análisis químico proximal de maíz y tortillas

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis químico proximal del maíz sin procesar usado como materia prima para hacer el nixtamal, utilizado en elaboración de las tortillas con las diferentes alternativas

de fortificación y de la tortilla integral fortificada. El contenido de proteína del maíz fue mayor que en la tortilla de nixtamal TN. Esto es, el maíz durante la transformación a tortilla pierde aproximadamente 1-1.8% de proteínas solubles. La tortilla de nixtamal fortificada con 4% de pasta de soya presentó porcentajes de proteína de aproximadamente 3% mayores que la TN y 2% mayores que el valor de la proteína

encontrada en el maíz. Este incremento se debe al alto valor de proteína en la pasta de soya desgrasada (48.7%) utilizada en la preparación de los tratamientos. Incrementos de 3% de proteína fueron encontrados en tortillas fortificadas con 8% (base seca) de pasta de soya (25, 27, 14) y para tortillas fortificadas con soya integral al 12% (base seca) (28).

TABLA 2
Evaluaciones de calidad en las tortillas fortificadas

Parámetro	L ¹	a	b	Olor	Sabor	Inflado	Rolabilidad	Pérdida de peso (%)
TN (Control)	77.32±2.32 a	1.68±0.96 c	24.69±1.76 c	Bueno	Bueno	2.0±0.83 a	1.0±0.00 d	23.45±3.54 ab
TN+0.1% Vitaminas	69.15±0.46 d	2.61±0.59 a	32.66±2.27 b	Regular	Regular	1.0±0.00 c	2.0±0.00 a	24.82±3.91 a
TN+0.15% Vitaminas	71.61±1.28 b	1.98±0.55 b	37.28±1.28 a	Ligero olor a vitaminas	Algo amargo	1.0±0.00 c	1.3±0.48 c	23.93±5.96 ab
TN+4% soya	71.03±0.19 bc	2.21±0.18 b	22.48±0.78 d	Bueno	Bueno	1.3±0.48 b	1.6±0.48 b	22.12±1.67 b
N+6% soya	70.66±1.43 c	2.02±0.38 b	22.22±0.42 d	Bueno	Bueno	1.3±0.48 b	1.6±0.48 b	19.31±2.85 c

TN=Tortilla de nixtamal.

¹L=luminosidad con escala de 0=negro a 100=blanco; 'a' con valores de rojo a verde; 'b' con valores de amarillo a azul.

Inflado. Escala 1=100% inflado, 2=50% y 3 no inflan las tortillas.

Rolabilidad. Escala 1= no se rompe, 5= 100% de rompimiento al enrollamiento del taco. Pérdida de peso durante el cocimiento de la tortilla.

Medias ± desviación estándar seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P<0.05)

TABLA 3
Análisis proximal de tortillas con diferentes tratamientos y materia prima¹

Dietas	Humedad %	Proteína %	Fibra Cruda %	Extracto etéreo %	Cenizas %
Maíz	8.72±2.14 a	8.84±0.33 bdc	2.23±0.00 ab	5.92±0.19 a	1.51±0.34 c
TN	7.74±1.21 a	6.99±0.26 d	1.87±0.37 b	4.36±0.31 bc	1.74±0.16 bc
TNV	7.29±0.99 a	7.60±0.00 cd	2.28±0.00 ab	4.21±0.06 c	1.68±0.04 bc
TNS	7.28±1.01 a	10.91±0.02 b	2.39±1.15 ab	4.12±0.17 c	2.20±0.27 bc
TNVS	7.07±0.74 a	11.02±1.15 b	2.24±1.41 ab	4.19±0.00 c	2.25±0.28 b
TIS	6.80±1.70 a	9.78±1.44 bc	2.55±1.67 ab	4.78±0.45 b	1.85±0.26 bc
Soya	9.57±0.61 a	48.7±0.98 a	3.85±0.45 a	0.96±0.31 d	6.63±0.36 a
Harina ²	9.11±1.71	6.70±0.28	1.56±0.50	4.80±0.24	1.24±0.15
³ Tortilla	38.2 - 45.04 ⁴	5.2 - 7.2	0.7 - 1.1	0.8 - 3.8	0.9 - 1.4
⁵ Tortilla	38.2 - 43.6 ⁴	5.4 - 6.1	1.3 - 1.7	0.8 - 1.0	0.9 - 1.3
⁶ Tortilla tradicional	38.9-43.7 ⁴	7.8-10.3	NR ⁷	NR ⁷	1.55-1.69

Medias±desviación estándar seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P<0.05).

TN = Tortilla de nixtamal; TNV = tortilla de nixtamal con 0.15% de vitaminas de la premezcla; TNS =Tortilla de nixtamal con 4% de pasta de soya desgrasada y cocida; TNVS = Tortilla de nixtamal y 0.15% de vitaminas y 4% de pasta de soya, TIS =Tortilla integral más 4% de pasta de soya desgrasada y cocida, y Soya= Pasta de soya desgrasada y cocida.

¹.Datos calculados en base seca. ².Tortilla de harina de maíz nixtamalizado comercial con vitaminas y minerales.

³Ranhotra (37). ⁴Humedad en tortilla fresca. Factor de conversión N x 5.7. ⁵Saldana and Brown (38) N x 6.25. ⁶Cravioto et al. (36). Factor de conversión N x 6.25. ⁷No reportado.

En el caso del aprovechamiento integral del grano, se han desarrollado nuevos procesos de nixtamalización que permiten el incremento nutricional de la tortilla aprovechando todas las partes del grano (2,18). Las tortillas integrales (TI) y las tortillas integrales con 4% de pasta de soya (TIS) obtenidas mediante el proceso desarrollado por el CINVESTAV, se incluyeron en el estudio para evaluar las pérdidas de nutrientes durante el lavado. La tortilla integral conserva los nutrientes de las capas externas del maíz (pericarpio) que en el proceso tradicional de nixtamalización se pierden con el agua de lavado o nejayote. En el pericarpio se concentran gran cantidad de proteínas de buena calidad, vitaminas, minerales y fibra dietaria que en el proceso del CINVESTAV se aprovechan para incrementar los niveles nutricios de la tortilla. Como se esperaba las tortillas (TI y TIS) elaboradas con el proceso CINVESTAV, presentaron mayores valores de fibra comparadas con la TN del proceso tradicional. Estos niveles se deben a que en la tortilla integral se utiliza el grano entero, por lo que la presencia del pericarpio participa en el contenido de la fibra. Por otra parte, aunque el objetivo de este trabajo no fue evaluar la calidad de esta tortilla integral, sí es pertinente mencionar que el pericarpio no afectó negativamente las características de calidad de la tortilla y el color, sabor y aroma fueron comparables o superiores a los de la TN.

Con respecto al contenido de cenizas, se puede observar una tendencia al incremento en los tratamientos de tortillas en comparación con el maíz sin procesar (Tabla 3). Esta tendencia se hace más evidente para los contenidos de calcio presentados para las diferentes tortillas (Tabla 4). El maíz sin procesar presentó un contenido de calcio de 7.7 mg/100 g comparado con 114 mg/100 g para TN y 212.5 mg/100 g para TNS. Estos datos concuerdan con los reportados por Bressani et al (29), Serna-Saldivar et al (14, 30) y Gómez et al (17), quienes indicaron que durante el proceso térmico alcalino de nixtamalización se incrementa la biodisponibilidad de niacina en las tortillas, además que incrementan su contenido de calcio con respecto al maíz crudo en un rango de 2000%. Este hecho es muy importante desde el punto de vista nutricional ya que la tortilla representa una importante fuente de ingestión de este mineral y de esta vitamina (31). También el calcio está involucrado en funciones fisiológicas como coagulación de la sangre y actividad neuromuscular. De acuerdo con Karanja y McCarron (32), una dieta deficiente en calcio puede predisponer a la susceptibilidad a hipertensión e incrementar el riesgo de osteoporosis.

Como se esperaba las tortillas con la premezcla de vitaminas y minerales incrementaron sus niveles de hierro y zinc (Tabla 4), es importante de recalcar es que las tortillas que fueron fortificadas con pasta de soya presentaron

importantes niveles de Fe. Se ha mencionado que para que el hierro sea absorbido, la adición de este mineral debe de estar acompañada con una adición de zinc para mantener un equilibrio en la dieta (33). Esto parece ser válido para hierro y zinc incorporado en soluciones acuosas o bebidas pero no cuando estos minerales son suministrados en alimentos sólidos donde este efecto no es observado (34,35). Esta controversia se explica debido a que estos elementos son muy similares químicamente y comparten la misma ruta para la absorción dentro de la célula, resultando en mayor competencia en alimentos acuosos que en alimentos sólidos (34). Tablas 3 y 4 muestran que en general la TN presentó valores de fibra cruda, grasa y cenizas además del Ca, Fe y Zn similares a los reportados para tortilla de nixtamal tradicional de Cravioto et al (36). Por otra parte, Ranhotra (37), Saldana y Brown (38), encontraron valores de análisis proximal y minerales para tortilla de maíz en Estados Unidos muy similares a los valores de la tortilla elaborada con harina de maíz nixtamalizado de este estudio y relativamente bajos comparada con TN y tortilla de nixtamal reportada por Cravioto (36). La tortilla de maíz elaborada con harina de maíz nixtamalizado generalmente presenta bajos valores debido a un excesivo lavado del nixtamal para retirar cal, pericarpio y otras sustancias solubles (38).

TABLA 4
Análisis de minerales en tortillas con diferentes
tratamientos y materia prima¹

Dieta	Calcio mg/100 g	Hierro mg/100 g	Zinc mg/100 g
Maíz	7.7	2.9	1.4
TN	114.0	1.2	1.8
TNV	131.3	4.5	2.0
TNS	212.5	3.3	2.3
TNVS	199.9	5.2	NR ⁵
TIS	153.7	5.0	1.7
SOYA	351.2	17.0	2.0
HARINA ² .	89.4	4.8	1.8
³ Tortilla de maíz	87-205	1.2-1.9	1.1-1.4
⁴ Tortilla de maíz	87.3-210.0	1.2-1.8	NR ⁵
⁶ Tortilla tradicional	178-214	3.2-4.5	NR ⁵

¹. Datos calculados en base seca. TN = Tortilla de nixtamal; TNV = tortilla de nixtamal con 0.15% de vitaminas de la premezcla; TNS = Tortilla de nixtamal con 4% de pasta de soya desgrasada y cocida; TNVS = Tortilla de nixtamal y 0.15% de vitaminas y 4% de pasta de soya; TIS = Tortilla integral más 4% de pasta de soya desgrasada y cocida; y Soya = pasta de soya desgrasada y cocida. ². Tortilla de harina de maíz nixtamalizado comercial con vitaminas y minerales. ³ Ranhotra (37). ⁴ Saldana and Brown (38). ⁵ N x 6.25 ⁶ Cravioto et al., (36).

Pérdidas de vitaminas hidrosolubles en maíz y tortillas

En la Tabla 5 se presentan los resultados del análisis de vitaminas realizados al maíz y a las diferentes tortillas fortificadas. Durante la transformación de maíz a tortilla de nixtamal (TN) se pierden 29.0% de niacina, 36.4% de tiamina, 46.3% de ácido fólico y 80% de riboflavina, como se puede observar las vitaminas que más se pierden son la riboflavina (80%) y el ácido fólico con (46.3%). La tiamina y niacina presentan pérdidas de 36.4% y 36.9% respectivamente. Estas pérdidas del proceso tradicional se pueden separar en dos partes. Pérdidas de componentes solubles durante el lavado del nixtamal y pérdidas durante el cocimiento de la tortilla. El uso del método del CINVESTAV para la elaboración de la tortilla integral donde el nixtamal se elabora sin efluentes del nixtamal nos permite determinar el porcentaje de cada uno de los componentes perdidos durante las etapas de elaboración de la tortilla tradicional.

TABLA 5
Análisis de vitaminas hidrosolubles en los diferentes
tratamientos de tortillas^{1,2}

Dieta	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Acido fólico
Maíz	0.44±0.028 d	0.60±0.030 c	2.14±0.053 e	0.082±0.003 a
TN	0.28±0.029 f	0.12±0.017 e	1.52±0.030 g	0.044±0.003 d
TNV	0.60±0.032 b	0.71±0.038 b	2.80±0.042 b	0.045±0.003 d
TNS	0.56±0.029 bc	0.61±0.037 c	2.02±0.046 f	0.062±0.004 c
TNSV	0.72±0.029 a	0.78±0.048 *	2.92±0.038 a	0.070±0.003 b
TI	0.36±0.033 e	0.50±0.032 d	2.31±0.065 d	0.065±0.003 c
TIS	0.52±0.039 c	0.61±0.026 c	2.60±0.038 c	0.072±0.004 b
³ Tortilla de maíz	0.07-0.22	0.04-0.10	0.85-2.11	0.014-0.019
⁴ Tortilla de maíz	0.00-0.22	0.06-0.12	0.85-1.38	NR ⁵
³ Tortilla tradicional	0.29-0.37	0.08-0.12	1.46-1.89	NR ⁵

¹mg/100 g de muestra.

²Medias ± desviación estándar seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P<0.05).

TN = Tortilla de nixtamal; TNV = tortilla de nixtamal con 0.15% de vitaminas de la premezcla; TNS = Tortilla de nixtamal con 4% de pasta de soya desgrasada y cocida; TNSV = Tortilla de nixtamal y 0.15% de vitaminas y 4% de pasta de soya; TI = Tortilla integral y TIS = Tortilla integral más 4% de pasta de soya desgrasada y cocida.

³Ranhotra (37). ⁵No reportado

⁴Saldana and Brown (38).

⁶Cravioto et al (36).

Tomando la tortilla de maíz como 100% de nutrientes y restando a los porcentajes de pérdidas totales de la tortilla de nixtamal con los encontrados en la tortilla integral nos permite determinar las pérdidas de la tortilla por el lavado. En la etapa de lavado del nixtamal, la tiamina perdió 18.2%, la riboflavina

16.7% y el ácido fólico 20.7% sin embargo la niacina aunque presentó 29.0 % de pérdidas en el todo el proceso tradicional hubo una liberación de niacina con un balance positivo de 7.9%. Bressani et al (39) indicaron que el endospermo del grano de maíz contribuye con el 80% de la niacina, el germen con el 11% y el pericarpio con el 9% y durante el procesamiento se pierden 19%, 56% y 100% de niacina respectivamente de estas fracciones del grano, lo que suma un 30.36% de pérdidas totales lo cual es muy similar al 29% encontrado en el presente estudio. Las pérdidas durante el cocimiento de la tortilla fueron muy elevadas especialmente para la riboflavina ya que del 80% de pérdidas durante el procesamiento, el 63.84% se presentó en el cocimiento de la tortilla y el 16.7% en el lavado del nixtamal. Los otros componentes con más pérdidas durante el cocimiento fueron el ácido fólico con 25.6% y la tiamina con 18.2%.

CONCLUSIONES

Se evaluaron tratamientos de tortillas fortificadas ya sea con 0.15% de una premezcla de vitaminas y minerales o con 4% (base húmeda) de pasta de soya desgrasada, debido a que en ensayos preliminares se estableció que valores superiores de estos nutrientes afectaron el sabor color y calidad de la tortilla. La textura al corte o al masticado de la tortilla se afectó favorablemente con la adición de soya y vitaminas en los niveles mencionados ya que dichas tortillas presentaron textura más suave. El maíz pierde aproximadamente 1.8% de proteínas solubles durante su transformación a tortilla, mientras que la tortilla de nixtamal fortificada con 4% de pasta de soya presentó cerca de 3% mas proteína que la TN y 2% más proteína que la encontrada en el maíz utilizado como materia prima. El proceso de nixtamalización y la fortificación de la tortilla, ya sea con soya o con vitaminas y minerales incrementaron significativamente los niveles de calcio en la tortilla, este hecho es muy importante desde el punto de vista nutricional, ya que la tortilla representa una importante fuente de ingestión de este mineral que previene la osteoporosis. Las pérdidas de vitaminas hidrosolubles durante la transformación de maíz a tortilla, fueron muy importantes, en total se perdieron 29.0% de niacina, 46.3% de ácido fólico, 36.4% de tiamina y 80% de riboflavina. Los componentes vitamínicos que más se perdieron fueron la riboflavina y el ácido fólico, cuyas pérdidas fueron muy elevadas especialmente durante la etapa de cocción de la tortilla.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo de Ciencia y Tecnología de Querétaro (CONCYTEQ), y a la Universidad Autónoma de

Aguascalientes por el apoyo económico para la realización de este trabajo. También agradecemos la valiosa participación y apoyo técnico en los trabajos de fortificación de la tortilla de las siguientes personas: Rivelino Flores, Eduardo Morales, José Juan Véles, Carmen Santoyo, Esmeralda Rebollar, Marcela Gaytán y Araceli Mauricio.

REFERENCIAS

- Lachance PA. La Filosofía de la Fortificación Aplicada al Maíz. En: Bressani R, Braham JE, Béhar M, eds. *Mejoramiento Nutricional del Maíz*. Guatemala. INCAP. 1972.
- Figueroa JDC, González-Hernández J, Arámbula VG, Morales SE. *Tecnologías Ecológicas para la Producción de Tortilla. Avance y Perspectiva* 1997;16:363-374.
- González-Hernández J, Figueroa JDC, Martínez L, Vargas H, Sánchez-Sinencio F. Technological Modernization of the Alkaline Cooking Process for the Production of Masa and Tortilla. En: Gazzinelli R, Moreira RL, Rodrigues WN, eds. *Physics and industrial development: Bridging the gap*. Singapore and London. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1997;126-178.
- Muñoz M, Chávez A. El impacto del maíz fortificado con proteínas y micronutrientes en una comunidad rural. Informe técnico de la evaluación anual sobre el efecto nutricional de la harina de maíz nixtamalizada fortificada. -Yosphi-El Rincón, San Ildefonso, Querétaro. México. Instituto Nacional de Nutrición «S.Z.». 1998.
- Elías LG, Bressani R. Valor Nutritivo de la Proteína de Harina de Tortilla y su Mejoramiento por Medio de Fortificación en Centro América. En: Bressani R, Braham JE, Béhar M, eds. *Mejoramiento Nutricional del Maíz*. Guatemala. INCAP 1973;172-194.
- Figueroa JDC, Martínez BF, González-Hernández J, Sánchez F, Martínez L, Ruiz M. Modernización Tecnológica del Proceso de Nixtamalización. *Avance y Perspectiva* 1994;13:323-329.
- Ranhotra GS, Gelroth JA, Leinen SD, Schneller FE. Bioavailability of calcium in breads fortified with different calcium sources. *Cereal Chem* 1997;74(4):361-363.
- Poneros AG and Erdman JW. Bioavailability of calcium from tofu, tortillas, nonfat dry milk and mozzarella cheese in rats: effect of supplemental ascorbic acid. *J Food Sci* 1988;53(1):208-210.
- Massieu G, Cravioto OY, Cravioto RO, Figueroa F de M. Estudios sobre Proteínas y Aminoácidos de Dietas Mexicanas. III. Eficiencia Proteica de Dietas a Base de Tortilla, Suplementadas con Frijol, Garbanzo o Leche por el Método de Crecimiento de la Rata Blanca. *Ciencia* 1954;14:93-97.
- Cravioto RO, Cervantes MM. Eficiencia proteica de la harina de masa enriquecida con harina de soja y de la adicionada con proteínas de ajonjolí. *Ciencia* 1965;24:159-162.
- Wild-Altamirano C. Presentación de trabajos Realizados en México sobre Enriquecimiento de la Harina de Maíz. En: Bressani R, Braham JE, Béhar M, eds. *Mejoramiento Nutricional del Maíz*. Guatemala. INCAP. 1973;87-89.
- Bressani R. La importancia del maíz en la nutrición humana en América Latina y otros países. En: Bressani R, Braham JE, Béhar M, eds. *Mejoramiento Nutricional del Maíz*. Guatemala. INCAP. 1972;5-30.
- Bressani R, Marengo E. 1963. The enrichment of lime-treated corn flour with proteins, lysine and tryptophan and vitamins. *J Agric Food Chem* 1963;6:517-522.
- Serna-Saldívar SO, Cannet R, Vargas J, González M, Bedolla S, Medina C. Effect of Soybean and Sesame Addition on the Nutritional Value of Maize and Decorticated Sorghum Tortillas Produced by Extrusion Cooking. *Cereal Chem* 1988;4:44-48.
- Rubio M. La Industria de la Harina y la Tortilla de Maíz. *Industria Alimentaria* 1993;9-19.
- Vázquez CG, Salinas MY. El Mejoramiento de la Calidad de la Tortilla de Maíz. En: Torres F, Moreno E, Chong I, Quintanilla J, eds. *La Industria de la Masa y la Tortilla*. México: PUAL, UNAM, 1996;127-138.
- Gómez AC, Martínez B.F, Figueroa JDC, Ordorica FC, González HJ. Cambios en Algunos Componentes Químicos y Nutricionales Durante la Preparación de Tortillas de Maíz. *Arch Latinoamer Nutr* 1996;46(4):315-319.
- Gómez-Aldapa C, Martínez-Bustos F, Figueroa JDC, Ordorica FCA. A comparison of the quality of corn tortillas made from corn flours by traditional or extrusion processing. *J Food Sci. And Tech* 1999;34:391-399.
- Bedolla S. Development and characterization of instant tortillas flours from sorghum and corn by infra-red cooking (micronizing) and extrusion cooking. PhD Thesis. TX, EUA Texas: A & M University, Collage Station. 1983.
- AACC Approved Methods of American Association of Cereal Chemists. 9th ed. St Paul MN. 1995.
- Fellman JK, Artz WE, Tassinari PD, Cole CL, Agustin J. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid chromatography. *J Food Sci* 1982;47:2048-2051.
- Lam FL, Holcomb IJ, Fusari SA. Liquid chromatography assay of ascorbic acid, niacinamide, pyridoxine, thiamine, and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. *J Assoc Off Anal Chem* 1994;67(5):1007-1012.
- Statistical Analysis System (SAS). SAS User's Guide. Version 6, Fourth Edition. Volume 1, Cary NC, USA. SAS Institute Inc. 943 pp. 1990.
- Collins JL, Sánchez JF. Quality parameters of tortillas fortified with soy and cheese. *J Food Sci.* 1980;45:667-679.
- Del Valle FR, Pérez-Villaseñor J. Enrichment of tortillas with soy proteins by lime cooking of whole raw corn-soy bean mixtures. *J Food Sci.* 1974;39:244-247.
- Ronney L. Efecto de la adición de proteínas de soya en la calidad de las tortillas. En: *Excelencia en la calidad en la calidad para la tortilla de maíz*. Reporte de investigaciones de la Asociación Americana de Soya 1999;1-22.
- Del Valle FR. Industry-government nutrimental improvement programs: an experience in Mexico. *Food Technology*, 1962;121-126.
- Green JR, Lawhon JT, Cater CM, Mattil KF. Utilization of whole undeffatted glandless cottonseed kernels and soybeans to protein-fortify corn tortillas. *J Food Sci.* 1977;42(3): 790-794.

29. Bressani R, Scimshaw NS. Effect of lime treatment on in vitro availability of essential amino acids and solubility of protein fractions in corn. *Agri Food Chem* 1958;6:774-778.
30. Serna-Saldivar SO, Knabe DA, Rooney LW, Tanksley TD, Sproule AM. Nutritional value of sorghum and maize tortillas. *J Cereal Sci* 1988;7:83-94.
31. Koetz R, Neukom H. Nature of bond nicotinic acid in cereal and its release by thermal and chemical treatment. En: Hoyden T, Kvale O, eds. *Physical, Chemical and Biological Changes in Food Caused by Thermal Processing*. London:Applied Science Publishers, 305. 1977.
32. Karanja N, McCarron D. The calcium-blood pressure hypothesis: Evidence for its validity. *Cont. Nutrition* 1984;9(1):1-3.
33. Casanueva E. La adición de nutrimentos a las harinas de maíz y de trigo: Un caso de enriquecimiento explicable. *Cuadernos de Nutrición* 1999;22(2):69-76.
34. Whittaker P. Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:442S-445S.
35. Solomons NW. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. *J Nutr.* 1986;116:927-935.
36. Cravioto RO, Anderson RK, Lockhart EE, Miranda F de P, Harris RS. Nutritive value of the Mexican tortilla. *Science* 1945;102(2639):91-93.
37. Ranhotra GS. Nutritional profile of corn and flour tortillas. *Cereal Food World* 1985;30(10):703-704.
38. Saldana G, Brown HE. Nutritional composition of corn and flour tortillas. *J Food Sci.* 1984;49:1202-1205.
39. Bressani R, Gomez-Brenes R, Scrimshaw NS. Effect of processing on distribution and in vitro availability of niacin of corn (*Zea mays*). *Food Tech* 1961;450-454.

Recibido:06-01-2000
Aceptado: 10-07-2001

Mezclas legumbre/cereal por fritura profunda de maíz amarillo y de tres cultivares de frejol para consumo "snack"

María Luz Hurtado P., Berta Escobar A. y Ana María Estévez A.

Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago

RESUMEN. Como una manera de aumentar el consumo de legumbres y mejorar la calidad de la proteína entregada en los productos tipo "snack", se formularon mezclas de frejol/maíz fritos en diferentes proporciones: 60:40 (A); 50:50 (B) y 40:60 (C).

El maíz frito utilizado para realizar estas mezclas se sometió a una solución de remojo predeterminada (NaOH/EDTA) y posteriormente fue sacochada por 5 minutos. Cada cultivar de frejol (Pinto 114, Suave 85 y Tórtola Inia) se mezcló con maíz amarillo dentado frito en las proporciones ya descritas, formulándose nueve mezclas las que se caracterizaron química, física y sensorialmente. Estas mezclas resultaron ser muy homogéneas en todas sus características analizadas. Se destacó el contenido de proteína de la mezcla A, que resultó ser mayor que las otras dos proporciones, pero en el análisis sensorial resultó ser la mezcla menos aceptada. El contenido de humedad y la actividad de agua de estas mezclas fue bajo, lo cual asegura una buena estabilidad microbiológica en almacenamiento. La elección de la mejor mezcla legumbre-cereal se realizó por el aporte proteico de cada especie en las diferentes proporciones formuladas. De esta manera se buscó que este aporte proviniera en un 50% del frejol y el otro 50% del maíz, y sólo la mezcla C fue la que más se acercó a esta condición, en el caso de frejol Pinto 114. Para los otros frejoles, la mejor proporción fue la C, en cuanto a aceptabilidad, a pesar de presentar un menor aporte de proteínas.

Palabras clave: Mezclas legumbre/cereal, proteínas, "snack".

SUMMARY. Deep frying snack product of legume/cereal mixture based on corn and three varieties of beans. To increase legume consumption and give a better protein quality in the snack products, mixtures of fried beans-corn were formulate in different proportions: 60:40 (A); 50:50 (B) and 40:60 (C). Fried corn used in mixtures was previously soaked in a predetermined solution (NaOH/EDTA) and then blanched. Three beans varieties (Pinto 114, Suave 85 and Tórtola Inia) were mixed with fried yellow dent corn in the above described proportions, obtaining nine mixtures whose physical, chemical and sensorial characteristics were evaluated. The mixtures were very homogeneous in all the analyzed characteristics. The protein content for the A mix was the greatest, nevertheless the sensorial analysis showed the last acceptance. The moisture content and water activity of these mixtures was low assuring a good microbiological stability under storage conditions. The protein contribution of each specie in different prepared mixtures determined the selection of the best cereal/legume mix. From a nutritional stand point the best results were obtained when the 50% of protein was supplied by beans and the 50% by corn. From the mixtures tried in this study, mix C with bean Pinto 114 one closed to the recommended conditions. Nevertheless, for each cereal/legume mix, the best proportion was C, due to its better acceptability, even though it had less nutritional value.

Key words: Legume/cereal mix, proteins, snack.

INTRODUCCION

La alimentación humana ha contado siempre con los cereales como la principal fuente de calorías y proteínas. Pero una nutrición basada sólo en ellos es deficitaria en muchos aspectos, por lo que requiere el complemento de las leguminosas (1,2).

Los cereales representan una importante fuente de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), y sus niveles son adecuados para compensar los bajos valores existentes en las leguminosas (3-5). Es por esto, que ciertas combinaciones de cereales y leguminosas pueden ser muy convenientes desde el punto de vista nutricional. Al formularlos en mezcla, se puede obtener un incremento en el balance aminoácido; por lo tanto, el ingerir cereales y leguminosas juntos, proporciona a la calidad de la proteína

consumida un valor superior al obtenido si se ingerieran por separado (1,2).

El término "snack" o alimento "snack" es difícil de definir. Se entiende por "snack" aquel producto de fácil consumo, accesible, de tamaño pequeño, sólido o líquido, que requiere poca o ninguna preparación y su finalidad es satisfacer la sensación de hambre que se produce entre comidas (6). Los "snacks" por lo general no se consideraban como verdaderos alimentos, ya que eran cuestionados por su bajo valor nutritivo. Sin embargo, estos productos han ido evolucionando de acuerdo a las exigencias de los consumidores (7).

Debido al auge que han tomado en los últimos tiempos, los productos naturales, la producción de "snacks" se orienta a la búsqueda de productos más nutritivos, con un buen aporte de proteínas, calorías, fibra, ácidos grasos esenciales,

vitaminas y minerales. Se han realizado muchos intentos para elevar el valor nutritivo de la proteína en los productos a base de maíz, mediante combinaciones con leguminosas (7,2).

El consumo de "snacks" a nivel mundial y nacional es cada vez más importante. La idea es que estos productos además de sabrosos, sean nutritivamente más atractivos, por lo cual se ha trabajado, entre otros, en su producción mediante fritura profunda de granos, obteniendo "snacks" crocantes y de excelente apariencia y sabor (8).

Debido a lo anterior, este trabajo tuvo los siguientes objetivos:

- Definir una línea de flujo para la elaboración de granos fritos tipo "snack" utilizando maíz amarillo dentado.
- Obtener la mejor mezcla legumbre/cereal, después de evaluar química, física y sensorialmente cada una de ellas.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima

Para la formulación del maíz frito, se utilizó maíz amarillo dentado. Como solución de remojo se usó NaOH al 0,5% y sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0,03%. En la fritura se usó aceite de maravilla parcialmente hidrogenado y para realzar el sabor un 2% de sal yodada.

Para formular las mezclas legumbre/cereal, se usaron frejoles fritos investigados anteriormente, donde el tratamiento seleccionado para los cultivares Pinto 114 y Tórtola Inia, fue NaOH/agua crudo, y para el cultivar Suave 85, fue EDTA crudo. Las características físicas y químicas de los frejoles fritos se presentan en la Tabla 1 (resultados en manuscrito N° 1898, ALAN).

TABLA 1

Características físicas y químicas de los frejoles fritos utilizados en la formulación de mezclas legumbre/cereal

Frejol	Pinto 114	Suave 85	Tórtola Inia
		g/100g	
Humedad	5,6	7,0	7,7
		g/100 g de materia seca	
Proteínas	20,7	21,8	24,4
Lípidos	12,5	12,6	11,7
Cenizas	6,1	55,5	5,7
Fibra cruda	1,7	1,7	1,2
E.N.N*	59,0	58,4	57,0

* Extracto no nitrogenado, calculado por diferencia.

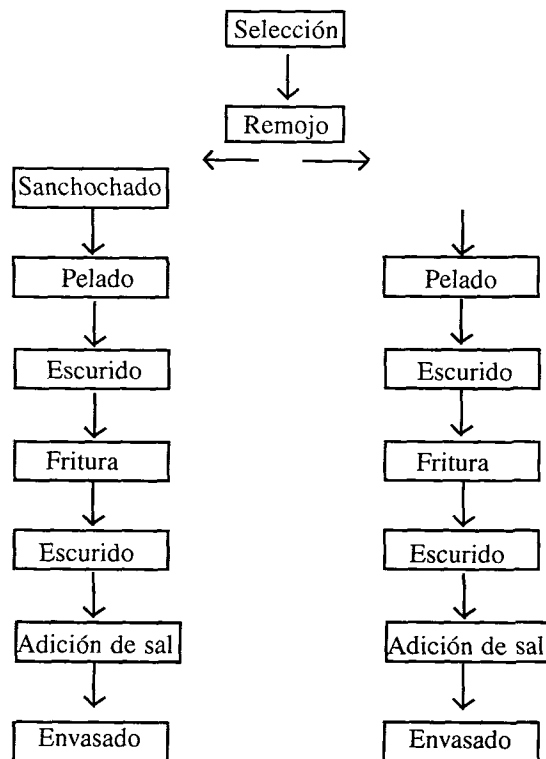
Elaboración del maíz frito

Los granos de maíz se sometieron a una solución de remojo, donde primero se usó NaOH al 0,5% por 4 minutos a 70°C, luego se lavó con agua hasta total eliminación de

reacción alcalina, y posteriormente los granos se dejaron remojando en sal disódica de EDTA al 0,03% durante 16 horas. Después del remojo, una parte de los granos se sometieron a un sancochado a sobre presión por 5 minutos, con una relación agua-cranos de 3:1. La otra parte de los granos se mantuvo en estado crudo hasta la operación de pelado. Esta operación se realizó en forma manual tanto para los granos crudos como los sancochados. La operación de fritura se realizó en una freidora Philips modelo HD 4253, por un tiempo de 5 minutos, con una temperatura de 190°C y en una relación aceite-grano de 4:1. Posteriormente se dejó escurrir el exceso de aceite y los granos se pusieron sobre papel absorbente, y se les adicionó un 2% de sal y se envasaron en bolsas de polipropileno transparente. En la Figura 1 se presentan las líneas de flujo propuestas para la elaboración de maíz frito.

FIGURA 1

Líneas de flujo propuestas para la elaboración de maíz frito tipo "snack"



Elaboración de las mezclas

Mediante una evaluación sensorial que se realizó al maíz frito, se determinó que el mejor tratamiento fue NaOH/EDTA sancochado, el cual se utilizó junto con los frejoles fritos,

para elaborar las mezclas legumbre/cereal en tres proporciones de frejol/maíz: 60/40, denominada mezcla A; 50/50, denominada mezcla B y 40/60 denominada mezcla C. Estas tres proporciones se aplicaron a cada uno de los cultivares de frejol: Pinto 114, Suave 85 y Tórtola Inia, por lo que en total se obtuvieron nueve mezclas.

Análisis físicos y químicos

Al maíz frito se le determinó, según el método de la AOAC (9), los siguientes análisis: humedad (sección: 14.003), lípidos (sección: 7.062), proteína (sección: 14.067), fibra cruda (sección: 7.070) y cenizas (sección: 14.006). A las mezclas legumbre/cereal sólo se les midió humedad, proteínas y lípidos. Además se midió actividad de agua (Aw) en determinador Lufft, modelo 5803.

Análisis sensorial

Tanto el maíz frito como las posteriores mezclas se sometieron a una evaluación sensorial, con pruebas de calidad y aceptabilidad, a las 24 horas de su elaboración. La aceptabilidad del producto se determinó por el método de la Escala Hedónica con pauta estructurada (escala de 1 a 9 puntos; 1= me disgusta extremadamente; 9 = me gusta extremadamente) con un panel no entrenado compuesto por 24 evaluadores. La determinación de calidad sensorial la efectuaron 12 evaluadores entrenados usando el método de Scoring.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para el maíz frito, se aplicó un diseño completamente al azar con dos tratamientos (crudo y sancochado) y 4 repeticiones. A los resultados se les aplicó un análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple cuando se presentó diferencia significativa.

Una vez formuladas las mezclas legumbre/cereal, los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANDEVA) y cuando existió diferencia significativa, se aplicó el test de comparación múltiple de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSION

Maíz frito tipo "snack"

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis de humedad y actividad de agua para el maíz frito. Se puede apreciar que el contenido de humedad presenta diferencia significativa, donde el tratamiento sancochado alcanza el mayor valor (7,5%), esto debido a que los granos fueron sometidos a un proceso de precocción lo cual aumenta el contenido de agua final en el producto. La actividad de agua no presenta diferencia significativa, pero el valor más alto también lo alcanza el tratamiento sancochado.

TABLA 2
Humedad y actividad de agua para maíz frito

Tratamiento	Humedad (%)	Aw
NaOH/EDTA crudo	3,9 b	0,49 a
NaOH/EDTA sancochado	7,5 a	0,57 a

Letras distintas indican diferencia significativa con error de 5%

En la Tabla 3 se puede observar que los tratamientos de maíz frito, tanto crudo como sancochado, no presentaron diferencias significativas en ninguno de los análisis. Tanto el contenido de lípidos, como ceniza y fibra cruda, presentan valores muy similares para ambos tratamientos. El contenido de proteínas en el maíz sancochado, presenta un valor levemente inferior que el maíz crudo, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa.

TABLA 3
Composición química de maíz frito (base materia seca)

Tratamiento	Lípidos	Proteína	Fibra cruda	Cenizas	ENN*
	g/100 g de materia seca				
NaOH/EDTA crudo	3,1 a	10,1 a	0,4 a	2,0 a	84,4 a
NaOH/EDTA sancochado	3,2 a	9,5 a	0,4 a	2,5 a	84,4 a

Letras distintas indican diferencia significativa con error de 5%.

* Extracto no nitrogenado. Calculado por diferencia.

Los resultados del análisis sensorial aplicado al maíz frito se presentan en la Tabla 4. En ella se puede observar que la apariencia de los productos elaborados presentó diferencia significativa calificando como apariencia "buena" al tratamiento NaOH/EDTA sancochado y como "más que regular" a NaOH/EDTA crudo. En cuanto a la intensidad de color hubo diferencia significativa donde el tratamiento crudo fue evaluado como "levemente oscuro" y el sancochado como "normal, moderado". El parámetro de salado también presentó diferencia significativa, sin embargo ambos tratamientos fueron evaluados con la misma intensidad que corresponde a "normal, moderado". El resto del análisis sensorial no presentó diferencia significativa, es así como la crocancia fue calificada como "algo dura", la textura como "más que regular" y el sabor de los productos fue evaluado como "normal, moderado", esto fue para ambos tratamientos. En el caso de aceptabilidad, a pesar de no presentar diferencia significativa, los tratamientos fueron evaluados como "me gusta algo" para NaOH/EDTA sancochado y como "me gusta medianamente" para NaOH/EDTA crudo.

TABLA 4
Calidad y aceptabilidad sensorial del maíz frito

Tratamiento	Apariencia	Color	Crocancia	Salado	Textura	Sabor	Aceptabilidad
NaOH/EDTA crudo	6,0 b	6,1 a	6,1 a	4,8 b	5,8 a	4,8 a	6,5 a
NaOH/EDTA sancochado	7,3 a	5,1 b	5,8 a	5,1 a	6,2 a	4,9 a	5,8 a

Letras distintas indican diferencia significativa con error de 5%.

El mejor tratamiento en maíz se seleccionó por el análisis sensorial aplicado a los dos productos, eligiéndose el tratamiento NaOH/Agua sancochado, ya que a pesar de tener en aceptabilidad un puntaje menor que el tratamiento NaOH/Agua crudo, pero igualmente aceptado, obtuvo mejor apariencia, color, crocancia, salado y textura.

Mezclas legumbre/cereal

Los resultados de los análisis físicos y químicos realizados a las mezclas se muestran en las Tablas 5 y 6. El comportamiento de las tres proporciones estudiadas en la mezcla frejol Pinto 114/maíz fue similar al que presentaron los productos por separado y los resultados de estos análisis no tuvieron diferencias significativas, a excepción del contenido de proteínas, donde la mezcla A, que tiene mayor proporción de frejol, obtuvo el valor más alto (17,6%). Esto era de esperarse, ya que el aporte de proteínas que hace el frejol Pinto 114 a la mezcla, es mayor al que hace el maíz (9,5%).

TABLA 5
Contenido de humedad y actividad de agua (Aw)
para mezcla de frejol/maíz

Mezcla	Frejol Pinto 114/maíz		Frejol Suave 85/maíz		Frejol Tórtola Inia/maíz	
	Humedad (%)	Aw	Humedad (%)	Aw	Humedad (%)	Aw
A	6,5 a	0,59 a	6,8 a	0,58 a	5,9 c	0,62 a
B	6,5 a	0,59 a	7,3 a	0,59 a	6,7 b	0,61 a
C	7,5 a	0,58 a	7,2 a	0,60 a	7,2 a	0,61 a

Letras distintas comparan verticalmente e indican diferencia significativa con error de 5%.

Proporción frejol/maíz A: 60/40; B: 50/50; C: 40/60.

Para la mezcla frejol Suave 85/maíz el comportamiento de las tres proporciones fue bastante similar, no se presentaron diferencias significativas a excepción del contenido de lípidos, donde la mezcla A presentó un valor significativamente mayor que la mezcla B y la C. Respecto al contenido de proteínas, cabe destacar que la mezcla A fue la que mayor porcentaje

de proteínas tuvo, y la mezcla B fue a su vez mayor que la C; de esta manera se puede asociar el contenido de proteínas con la proporción de las mezclas, ya que mientras menor es la cantidad de frejoles presentes en las mezclas, menor es el contenido proteico que ellas presentan. La actividad de agua fue bastante similar entre las mezclas y presentó valores muy adecuados para poder pensar que éstas no deberían tener problemas de desarrollo de microorganismos durante su vida útil.

TABLA 6
Contenido de lípidos y proteínas para las mezclas
de frejol/maíz (g/100 g base seca)

Mezcla	Frejol Pinto 114/maíz		Frejol Suave 85/maíz		Frejol Tórtola Inia/maíz	
	Proteína	Lípidos	Proteína	Lípidos	Proteína	Lípidos
A	17,6 a	10,9 a	16,6 a	14 a	18,2 a	8,3 a
B	11,4 b	11,7 a	15,6 a	12,5 b	14,5 ab	8,1 a
C	11,4 b	9,5 a	13,3 a	9,0 c	12,3 b	7,9 a

Letras distintas comparan verticalmente e indican diferencia significativa con error de 5%.

Proporción frejol/maíz A: 60/40; B: 50/50; C: 40/60.

Para la mezcla frejol Tórtola Inia/maíz el contenido de humedad de las proporciones difiere significativamente, siendo la mezcla C la que presentó mayor porcentaje (7,2%), y la A el menor (5,9%). Los lípidos de las tres mezclas son muy similares, la mezcla A presentó el mayor porcentaje (8,3) y la C el menor (7,9). El contenido de proteínas presentó diferencia significativa, que era lo esperado para este tipo de productos en mezclas. Una vez más, la mezcla A fue la que presentó el mayor valor en proteínas (18,2%). Este valor es significativamente mayor a las proteínas de la mezcla C (12,3%) e igual a B. La actividad de agua se presentó muy pareja en los tres tipos de productos e igualmente que las otras dos mezclas elaboradas (Pinto 114 /maíz y Suave 85 /maíz). En general, el contenido de humedad fue mayor en la proporción C, para todas las mezclas, esto debido a que el contenido de agua final del maíz fue más alto, en relación a los frejoles, aportando así una mayor humedad a la mezcla. Por otra parte, el contenido de lípidos de la proporción A fue

siempre mayor, debido a la mayor absorción de aceite que tuvieron los frejoles durante el proceso de fritura, en comparación con el maíz.

Los resultados del análisis sensorial de calidad y aceptabilidad realizado a las mezclas de frejol Pinto 114/maíz se presentan en la Tabla 7. En ella se puede observar que en general, estadísticamente, no existieron mayores diferencias. Los productos presentaron una buena apariencia, color normal y crocancia algo dura. Sólo la aceptabilidad de los productos presentó valores más alejados, presentándose diferencia estadística entre la mezcla A y C, donde la mezcla C obtuvo el puntaje más alto (7,1).

TABLA 7
Calidad y aceptabilidad sensorial de la mezcla frejol Pinto 114/maíz

Mezcla	Apariencia	Color	Crocancia	Sabor	Aceptabilidad
A	6,4 a	5,1 a	6,4 a	5,3 a	6,4 b
B	6,8 a	4,9 a	7,3 a	5,5 a	6,8 ab
C	6,6 a	5,1 a	7,1 a	5,4 a	7,1 a

Letras distintas comparan verticalmente e indican diferencia significativa con error de 5%.

Proporción frejol/maíz A: 60/40; B: 50/50; C: 40/60.

En la Tabla 8 se presentan los resultados del análisis sensorial realizado a las mezclas de frejol Suave 85/maíz, el cual no presentó diferencia significativa en ninguno de los parámetros medidos. La apariencia de los productos fue evaluada como "buena". El color fue homogéneo, y las tres mezclas fueron calificadas con un color "normal, moderado". La crocancia fue evaluada como "dura", al igual que las otras dos mezclas y algunos de los productos "snacks" elaborados previamente, lo que pasaría a ser una característica de este tipo de productos. El sabor, calificado como "normal, moderado", estuvo muy parejo, por lo que las proporciones de frejol/maíz no influyeron sobre este parámetro. La deferencia entre la aceptabilidad de las mezclas no fue significativa, sin embargo la mezcla más aceptada fue la B con 6,3 puntos, seguida de la C con 5,9 y finalmente la A con 5,6, lo que sensorialmente equivale a "me gusta algo".

El análisis sensorial de la mezcla Tórtola Inia/maíz (Tabla 9) no presentó diferencia estadística entre las distintas proporciones, sin embargo, sensorialmente se presentaron pequeñas diferencias entre los tratamientos, como en el caso de la apariencia, donde las mezclas B y C fueron calificadas con una apariencia "buena", y la mezcla A tuvo una apariencia "más que regular". Para las tres proporciones, el color fue calificado como "normal", la crocancia como "dura" y el sabor fue "normal, moderado". En relación a la aceptabilidad de los productos, la mezcla B alcanzó el mayor puntaje (6,7),

que corresponde a "me gusta medianamente", y las mezclas A y C fueron calificadas como "me gusta algo".

TABLA 8
Calidad y aceptabilidad sensorial de la mezcla frejol Suave 85

Mezcla	Apariencia	Color	Crocancia	Sabor	Aceptabilidad
A	6,6 a	4,9 a	6,8 a	4,9 a	5,6 a
B	6,7 a	5,1 a	6,5 a	5,2 a	6,3 a
C	6,5 a	4,9 a	6,9 a	5,2 a	5,9 a

Letras distintas comparan verticalmente e indican diferencia significativa con error de 5%.

Proporción frejol/maíz A: 60/40; B: 50/50; C: 40/60.

TABLA 9
Calidad y aceptabilidad sensorial de la mezcla frejol Tórtola Inia

Mezcla	Apariencia	Color	Crocancia	Sabor	Aceptabilidad
A	6,3 a	4,8 a	7,3 a	4,9 a	5,9 a
B	6,6 a	5,1 a	7,3 a	5,3 a	6,7 a
C	6,6 a	5,2 a	6,8 a	5,2 a	6,2 a

Letras distintas comparan verticalmente e indican diferencia significativa con error de 5%.

Proporción frejol/maíz A: 60/40; B: 50/50; C: 40/60.

Elección de la mejor mezcla legumbre/cereal

Cada una de las mezclas fueron analizadas física, química y sensorialmente y, en general, no se presentaron mayores diferencias entre las proporciones que se formularon para cada cultivar de frejol. La principal diferencia fue en el contenido de proteínas, donde la mezcla A siempre destacó por presentar el mayor porcentaje de este constituyente, lo cual era predecible, dada la mayor proporción de leguminosa de esta mezcla. Sin embargo, eso no la hizo la más aceptada, ya que de las tres proporciones formuladas, ésta fue la que obtuvo la calificación más baja en el análisis sensorial de aceptabilidad, y esto se repitió para los tres cultivares de frejol.

Por otra parte, las propiedades nutricionales de este tipo de mezcla, tendientes a incrementar el balance aminoacídico al formular juntos legumbres y cereales, son de gran importancia. De esta manera los autores Rockland y Radke (10) sugieren que para obtener valores óptimos de PER en mezclas de legumbres/cereal, el 50% de la proteína debe ser aportada por el frejol, y el otro 50% por el maíz. Para las mezclas formuladas en este estudio, la proporción C sería la mezcla que más se acerca a lo sugerido por los autores

mencionados, esto es, en la mezcla Pinto 114/maíz, el 57% de la proteína es aportada por el frejol y el 43% por el maíz; para la mezcla Suave 85/maíz, el frejol aporta un 66% de la proteína y el maíz lo hace en un 34%, finalmente en la mezcla Tórtola Inia/maíz un 67% de la proteína aportada por el frejol y el 33% restante por el maíz.

Por otra parte, de las mezclas elaboradas con frejol Pinto 114, la proporción C fue la más acertada sensorialmente con una calificación de 7,1. Para los frejoles Suave 85 y Tórtola Inia, las mezclas C fueron igualmente aceptadas con valores de 5,9 y 6,2 respectivamente.

Por las razones anteriormente expuestas, la elección de la mejor mezcla legumbre/cereal corresponde a la proporción C para los tres cultivares de frejol estudiados.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que:

- Es posible elaborar un producto crocante tipo "snack" por fritura profunda de maíz amarillo dentado con buenas características químicas, físicas y sensoriales.
- La línea de flujo definida para la elaboración de maíz frito fue: selección, remojo (NaOH/EDTA), sancochado (5 minutos), pelado (manual), fritura (5 minutos, 190°C), escurrido, salado (2%) y envasado.
- Para las mezclas legumbre/cereal, las tres proporciones estudiadas fueron muy homogéneas entre sí en términos de sus características químicas, físicas y sensoriales.
- La mezcla C fue seleccionada como la mejor proporción de las mezclas formuladas, debido a que el aporte proteico proveniente tanto del frejol como del maíz, fue el más balanceado, y en algunos casos, esto coincide con la mayor aceptabilidad de los productos.

Investigación financiada por el proyecto DTI A-3031.

REFERENCIAS

1. Aykroyd WR y Doughty J. Las leguminosas en la nutrición humana. FAO, Roma, 136p. 1982.
2. Almeida-Dominguez NG, Valencia ME and Higuera-Cipara I. Formulation of combase "snacks" with high nutritive value: biological and sensory evaluation. J Food Sci 1990;55(1):228-231.
3. Varriano-Marston E and De Omana E. Effects of sodium salt solutions on the chemical composition and morphology of back beans (*Phaseolus vulgaris*). J Food Sci. 1979;44(2):531-536.
4. Estévez AM. Las leguminosas de grano en la alimentación chilena. El Campesino. 1987;118(7):11-17.
5. Cancino AR. Elaboración de crocantes de leguminosas para consumo inmediato. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, 1990;60p.
6. Tettweiler P. Snack foods worldwide. Food Tech. 1991;45(2):58-62.
7. Torres E. "Snack": Alimento muchas veces controvertido. Alimentos Procesados. 1988; 7(10):14-16.
8. Estévez AM. Avances en la industrialización de leguminosas de grano. Alimentos 1990;15(5):64-67.
9. Association of Official Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC. 14th. Ed. Virginia; USA. 1984;1141p.
10. Rockland LB and Radke TM. Legume protein quality. Food Tech. 1981;35(3):79-82.

Recibido: 08-08-2000

Aceptado: 04-05-2001

Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central

Ricardo Bressani, Juan C. Turcios, Luis Reyes y Roberta Mérida

Instituto de Investigaciones-Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala

RESUMEN. El objetivo del presente estudio fue el de caracterizar las harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano que se comercializan en Centro América por algunas propiedades físicas y químicas que puedan contribuir en conocer su composición química y ser de ayuda a programas de nutrición y de fortificación de alimentos con micronutrientes. Se adquirieron 12 marcas en triplicado de los supermercados en Guatemala, El Salvador y Honduras, muestras que se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su análisis. Los parámetros físicos y resultados fueron: granulometría, con muchas harinas con niveles que no pasan 60 mesh, pH (5.4-7.5), índice de absorción de agua, WAI (3.4-4.0 g gel/g muestra), índice de sólidos en agua, WSI (4.8-7.8 g/100g) y densidad (0.410-0.547 g/ml). Las diferencias entre harinas fueron estadísticamente significativas para todos los parámetros, menos para WAI. Las características químicas incluyeron humedad, proteína, grasa, cenizas y fibra dietética. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre harinas con la excepción de la grasa. El contenido de proteína fue bajo, variando entre 6.7 - 8.1 g/100g y el de fibra dietética total entre 7.7-12.0 g/100g en base seca. Las muestras fueron analizadas por ácido fítico con una variación de 632 a 903 mg/100g, siendo las diferencias estadísticamente significativas. Las harinas fueron analizadas por su contenido de hierro total y soluble (pH 7.5), calcio, zinc, fósforo, potasio, magnesio, cobre y manganeso. Las diferencias en el contenido de calcio y hierro entre harinas fueron estadísticamente significativas. La variabilidad física y química entre las harinas de maíz nixtamalizado fue relativamente alta por lo que se recomienda que se establezcan estándares de calidad a través de materia prima y procesamiento, para una mayor efectividad de acciones en fortificación con micronutrientes que se pretenda realizar en el futuro.

Palabras clave: Harina nixtamalizada de maíz, características físicas y químicas, nixtamalización industrial de maíz, maíz nixtamalizado consumo humano.

INTRODUCCION

El maíz transformado principalmente en tortilla es el alimento que proporciona cantidades significativas de calorías, proteína y otros nutrientes a la dieta de grandes sectores de la población de Centro América, principalmente

SUMMARY. Physical and chemical characteristics of industrial nixtamalized maize flour for human consumption in Central America. The objective of this study was the characterization of industrial nixtamalized maize flour for human consumption and which are marketed in Central America for some selected physical and chemical properties which may contribute to food composition information and help nutrition and micronutrient fortification programs. A total of 12 brands purchased in triplicate were obtained from supermarkets in Guatemala, El Salvador and Honduras. These samples were kept under refrigeration until analyzed. The physical parameters measured and results were the following: particle size with most samples having a high percentage of particles greater than 60 mesh, pH (5.4-7.5), water absorption index (WAI) (3.4-4.0 g gel/g sample), water soluble index (WSI) (4.8-7.8 g/100g) and flour density (0.410-0.547 g/ml). The differences were statistically significant for all parameters measured, except for WAI. The chemical characteristics included, moisture, protein, fat, ash and dietetic fiber. Differences between flour samples were statistically significant except for fat content. Protein content was low, ranging between 6.7-8.1 g/100g and total dietary fiber varied between 7.7-12.0 g/100g. The samples were analyzed for phytic acid with a variation from 632 to 903 mg/100 g, with statistical significant differences. The samples were also analyzed for total and soluble (pH 7.5) iron, phosphorus, calcium, potassium, zinc, copper, manganese, and magnesium. The difference in the iron and calcium content between flour samples were statistically significant. The physical and chemical variability found between flour samples of nixtamalized maize was relatively high and it is recommended to establish quality standards through raw material and process standardization for greater effectiveness of nutrition programs and activities on micronutrient fortification which may be pursued in the future.

Key words: Nixtamalized maize flours, industrial nixtamalization physical and chemical characteristics, nixtamalized maize for human consumption.

Honduras, El Salvador y Guatemala (1). Hasta hace relativamente poco tiempo, el maíz era procesado por nixtamalización al nivel del hogar, sin embargo hoy día el uso de harinas nixtamalizadas industrialmente se están volviendo populares por su conveniencia en la preparación de la tortilla y de otras formas de consumo del maíz

nixtamalizado. Además estas harinas son por lo menos para cada marca más estables en su contenido de nutrientes, que el maíz utilizado por las amas de casa, lo que favorece los problemas asociados en encuestas de consumo y cálculo de ingestión de nutrientes. Asimismo, favorecen las posibilidades de mejoramiento de calidad nutricional por fortificación.

Gómez, y col (2) han descrito los pasos de transformación de maíz a harina nixtamalizada y la caracterización de esas harinas para diferentes productos alimenticios y Bedolla y Rooney (3) caracterizaron física y químicamente varias harinas nixtamalizadas de maíz, tanto de México como de Estados Unidos. Estos últimos autores indicaron que las propiedades de la harina que estaban bastante asociadas con la aceptabilidad de las tortillas fueron: a) la distribución y el índice del tamaño de partícula; la absorción de agua, el pH, color y la viscosidad máxima medida con el amilógrafo. Otras propiedades estudiadas como densidad de la harina, el contenido de humedad, proteína y almidón y el contenido de almidón susceptibles enzimas, no influyeron en la funcionalidad de las harinas y aceptabilidad de la tortilla. La variabilidad en composición química, posiblemente es atribuible a diferencias en procesamiento o variedad de maíz.

Para fines nutricionales, para el establecimiento de estándares de composición química y de valor nutritivo y para fines de mejoramiento de su calidad nutricional por fortificación es importante conocer la variabilidad que puede existir entre las marcas comerciales de las harinas nixtamalizadas de maíz. Por consiguiente el propósito de este estudio fue el de obtener información sobre algunas características físicas y químicas de un grupo de harinas comerciales de maíz nixtamalizado en Centro América.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización del estudio se obtuvieron de los supermercados, un total de 12 marcas de las cuales 6 fueron de Honduras, 2 de El Salvador y 4 de Guatemala. Se obtuvieron 3 bolsas de harina para fines de realizar análisis en triplicado. Los análisis físicos incluyeron densidad midiendo el volumen al compactar en un cilindro de 25 ml 20 g de harina y expresando el resultado como g/ml. El pH se determinó de acuerdo al método AOAC (4). La granulometría se obtuvo agitando por 15 min., 100 g de harina de acuerdo al método descrito por Bedolla y Rooney (3); el índice de absorción de agua (WAI) y solubilidad en agua (WSI) por el método descrito por Anderson y col. (5). Las muestras fueron analizadas por humedad, proteína, grasa y cenizas por métodos de la AOAC (4), y los minerales por absorción atómica (4). El contenido de ácido fólico se estableció por el método de Haug & Lantzsch (6). El ácido fólico extraído se precipitó con una solución ácida de hierro III de un contenido conocido. La disminución de hierro en el

sobrenadante es una medida del contenido de ácido fólico. Las muestras fueron analizadas por hierro soluble a pH 7.5 (7). Las muestras también fueron analizadas por fibra dietética de acuerdo al método de Englyst y col. (8).

RESULTADOS Y DISCUSION

Algunos datos de las características físicas de las 12 harinas estudiadas se resumen en la Tabla 1. La densidad de las harinas en g/ml varió entre 0.410 a 0.547 g/ml con un promedio de 0.498 con diferencias estadísticamente significativas. Estas cifras están cerca de los valores que se han informado en la literatura de 0.420 - 0.435 (3). Los valores altos de densidad sugieren que son harinas de una granulometría fina que empacan bien en el envase. El índice de absorción de agua (WAI) varió entre 3.41 a 4.02 g gel/g harina seca con un promedio de 3.71 g gel/g harina seca. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los valores de la literatura varían entre 4.20 a 4.40 para harinas nixtamalizadas en Estados Unidos y en México (3). Este índice está muy asociado al número y al peso de tortillas por 100 g de harina, o sea que las de mayor índice son las que dan mayor número y peso de tortillas. Así mismo la suavidad, dureza o sequedad de la tortilla están asociadas al WAI. El índice de solubilidad de los sólidos varió entre 4.77 a 7.00 g/100 g con un promedio de 5.74 g/100g, valores que están dentro de los valores informados en la literatura (2,3). Las diferencias fueron significativas estadísticamente. Finalmente el pH de la harina varió entre 5.40 a 7.51 con un promedio de 6.31 ± 0.64 . Este amplio rango sugiere que existen diferencias en el lavado del maíz cocido después de la cocción. Los valores de la literatura son entre 6.90 a 7.40 (3). La Tabla 2 resume la granulometría de las harinas, la mayoría de las cuales tenían un tamaño de partícula mayor de 60 mesh, lo cual no está de acuerdo a lo informado en la literatura, en la que se indica que las harinas son más finas.

Estas diferencias pueden ser debido a que en Centro América las tortillas se preparan con las manos y muy poco con máquinas, las cuales requieren una harina más fina.

La Tabla 3 presenta los datos de humedad, proteína, grasa y cenizas en las harinas industriales, siendo las diferencias entre ellas significativas al 0.01% con la excepción del contenido de grasa. El contenido promedio de humedad de 10.09 ± 1.80 g/100g es adecuado, sin embargo el contenido de proteína, con un promedio de 7.76 g/100g se considera del lado bajo. Los contenidos promedio de grasa y de ceniza son similares a los informados en la literatura (9-11).

TABLA 1
Algunas características físicas de las harinas de maíz nixtamalizadas industriales

Harina No.	Densidad g/ml	WAI g gel/g muestra	WSI g/100 g	pH
1	0.522 ab	3.57 a	5.80 abc	5.40 c
2	0.540 a	3.45 a	6.98 a	5.53 de
3	0.516 ab	3.60 a	7.00 a	6.00 c
4	0.547 a	3.86 a	6.79 ab	5.73 cd
5	0.530 ab	3.99 a	5.53 abc	6.57 b
6	0.460 bc	3.58 a	4.38 c	6.77 b
7	0.526 ab	4.02 a	5.95 abc	5.93 c
8	0.507 ab	3.66 a	5.62 abc	5.93 c
9	0.480 abc	3.50 a	4.77 bc	6.77 b
10	0.480 abc	3.41 a	5.10 abc	7.51 a
11	0.410 c	3.91 a	4.78 bc	6.73 b
12	0.460 bc	3.52 a	6.15 abc	6.83 b
Promedio ± DS	0.498 0.041	3.71 0.22	5.74 0.88	6.31 0.64
Literatura	0.435±0.044** 0.420±0.023*	4.40±0.6* 4.20±0.4**	5.00-7.20***	7.10±0.20 7.40±0.20 6.90

Harinas de México (3)

Harinas de Estados Unidos (3) *(2).

TABLA 2
Granulometría de las harinas, %

Harina No.	Mesh		
	No pasa 60	No pasa 80	+ de 80
1	86.5	12.0	1.5
2	34.0	59.5	1.5
3	42.0	51.5	6.5
4	16.5	81.5	2.0
5	-	-	-
6	82.0	18.0	0
7	38.5	49.5	12.0
8	71.0	22.5	1.5
9	41.0	58.0	1.0
10	77.0	17.5	5.5
11	72.4	25.0	2.6
12	54.0	44.5	1.5

Los datos de fibra dietética total, soluble e insoluble de las harinas se describen en la Tabla 4. Las diferencias entre harinas fueron estadísticamente significativas al 0.01%. El contenido promedio de FDT fue de 10.24 g/100g y el de la FDI de 8.12 g/100g, valores que están dentro de los rangos de la literatura (12). Sánchez - Castillo y col (13) informaron de valores para F.D. Total, Insoluble y Soluble para harina nixtamalizada de uso urbano de 6.5, 5.3 y 1.1 g/100g respectivamente. Para harina en área rural los valores fueron

8.3, 6.2 y 1.1 g/100g respectivamente. Los valores de fibra dietética dependen en parte del método de análisis y también de la eficiencia de remoción de la cáscara del maíz en procesamiento (12,14). Los datos sobre el contenido de ácido fítico, hierro total y hierro soluble (pH 7.5) se presentan en la Tabla 5. El ácido fítico varió entre 0.632 a 0.903 g/100g, con un promedio de 0.808 g/100g. Las cifras citadas en la literatura varían de 0.5 - 0.6 g/100g hasta 0.95 g/100g (15, 16, 21), de tal manera que las cifras de este estudio están dentro de lo informado en la literatura. Urízar y Bressani (18) informaron de un valor de 0.739 g/100g en harina nixtamalizada de maíz. Además indicaron que la cifra en la harina depende del nivel de cal y tiempo de cocción utilizado para cocinar el maíz. Khan y col. (19) utilizando otros métodos de procesamiento térmico del maíz, informaron de pérdidas entre 11.5 a 52.6%, indicando la alta estabilidad del compuesto en el maíz. Como es conocido el ácido fítico es un compuesto que influye sobre la biodisponibilidad del hierro y es deseable que su contenido en la harina sea el más bajo posible. El contenido de hierro total varió entre 1.66 a 4.79 mg/100g con un promedio de 2.53 mg/100g. Las cifras están dentro de la variabilidad que ha sido informada. El hierro soluble medido a pH 7.5 después de hidrólisis enzimática varió entre 0.39 a 0.57 mg/100 g con un promedio de 0.48 mg/100g. Este hierro representa entre el 9.4 al 30.1% del hierro total, con un promedio del 19%.

TABLA 3
Composición química de las harinas nixtamalizadas industriales de maíz, g/100 g

Harina No.	Humedad	Proteína	Grasa	Cenizas
1	8.29 e	7.88 ab	3.45 a	1.59 c
2	9.88 d	7.98 a	3.83 a	1.60 c
3	12.70 a	7.48 ab	2.16 a	2.70 ab
4	10.43 cd	7.75 a	3.77 a	1.79 abc
5	8.22 e	8.11 a	3.53 a	1.95 c
6	12.62 a	7.94 a	3.04 a	1.90 c
7	7.86 e	8.01 a	3.15 a	2.78 a
8	8.59 e	7.64 ab	2.72 a	1.65 bc
9	9.93 d	6.68 b	3.27 a	1.25 c
10	12.32 ab	7.77 ab	3.05 a	1.14 c
11	11.41 bc	7.46 a	3.42 a	1.39 c
12	8.83 e	8.11 a	3.23 a	1.22 c
Promedio	10.09	7.76	3.22	1.75
D.E.	± 1.80	0.41	0.46	0.53

Letras diferentes representan valor significativamente diferente.

Wyatt & Triana - Tejas (20) informaron que el hierro soluble en tortilla era del orden del 26% del hierro total. Correlaciones lineales simples entre ácido fítico y hierro

soluble y entre calcio y hierro soluble no alcanzaron significancia estadística. El contenido de calcio, zinc y fósforo en las harinas se presenta en la Tabla 6.

TABLA 4
Contenido de fibra dietética en harinas nixtamalizadas industriales de maíz, g/100g

Harina No.	Total	Insoluble	Soluble
1	7.75 b	6.78 bc	0.97 e
2	9.20 ab	7.26 abc	1.94 d
3	9.20 ab	6.31 c	2.89 c
4	9.20 ab	8.23 abc	0.97 e
5	10.16 ab	6.29 c	3.87 a
6	10.16 ab	7.26 abc	2.90 c
7	11.13 ab	8.23 abc	2.90 c
8	10.65 ab	8.72 a	1.93 d
9	11.62 a	10.65 ab	0.97 e
10	11.13 ab	10.16 ab	0.97 e
11	12.10 a	10.16 ab	1.94 d
12	10.55 ab	7.42 abc	3.13 b
Promedio	10.24	8.12	2.11
D.E.	± 1.23	± 1.52	± 1.01

TABLA 5
Contenido de ácido fítico, hierro total y hierro soluble en harinas nixtamalizadas de maíz

Muestra No.	Acido fítico, g/100g	Hierro total, mg/100g	Hierro soluble a pH 7.5 mg/100g	Soluble/total x 100
1	0.716 bcd	2.62 ab	0.39 f	14.9
2	0.889 a	2.12 b	0.52 c	24.5
3	0.874 ab	2.58 ab	0.45 e	17.4
4	0.810 abc	3.00 ab	0.44 e	14.7
5	0.632 d	2.62 ab	0.50 d	19.1
6	0.879 ab	4.79 a	0.45 e	9.4
7	0.755abcd	1.87 b	0.54 b	28.9
8	0.864 abc	1.66 b	0.50 d	30.1
9	0.842 a	2.16 b	0.50 d	23.1
10	0.703 cd	2.58 ab	0.57 a	22.1
11	0.903 a	1.79 b	0.45 e	25.1
12	0.775abcd	2.62 ab	0.43 e	16.4
Promedio	0.808	2.53	0.48	19.0
D.E.	0.090	0.82	0.05	-

Las diferencias entre harinas fueron significativas para calcio. El contenido varió entre 8 mg a 147 mg de calcio por 100 g de harina y se encontró no estar correlacionado con el pH. El contenido de calcio en harinas nixtamalizadas industriales es variable (1,10-12), pero es en promedio similar al de este informe de 97 mg/100g. La variabilidad se puede atribuir al nivel de cal usado en la cocción del maíz así como también al tiempo y tipo de remojo y lavado del grano cocido

que se haga. Con respecto al zinc, la variación fue de 1.4 a 2.8 mg/100g con un promedio de 1.9 ± 0.4 mg/100g, valor similar al informado en la literatura (1,10-12). Con respecto al fósforo el promedio fue de 0.27 ± 0.03 g/100g con una variabilidad de 0.22 a 0.35 g/100g. Finalmente la Tabla 7 resume los datos de potasio, magnesio, cobre y manganeso en las harinas comerciales nixtamalizadas de maíz. Se observó poca variabilidad con respecto al potasio y al magnesio, no así en el cobre y manganeso. Sin embargo, los valores son similares a los ya informados anteriormente (1,10-12).

TABLA 6
Contenido de calcio, zinc y fósforo en harinas nixtamalizadas industriales de maíz, mg/100g

Harina No.	Calcio	Zinc	Fósforo g/100g
1	69 bcd	1.8 a	0.26
2	85 abcd	2.1 a	0.35
3	150 a	1.8 a	0.28
4	84 abcd	1.4 a	0.28
5	64 cd	1.5 a	0.22
6	8 d	2.8 a	0.26
7	124 abc	1.5 a	0.28
8	113 abc	1.6 a	0.26
9	125 abc	2.6 a	0.25
10	147 ab	1.6 a	0.27
11	74 abcd	2.0 a	0.28
12	116 abc	1.8 a	0.25
Promedio	97	1.9	0.27
D.E.	40	± 0.4	0.03

TABLA 7
Contenido de varios minerales en harinas nixtamalizadas de maíz

No.	Potasio g/100g	Magnesio mg/100g	Cobre mg/100g	Manganeso mg/100g
1	0.24	0.10	0.12	0.40
2	0.27	0.10	0.27	0.48
3	0.26	0.11	0.18	0.51
4	0.25	0.10	0.18	0.48
5	0.24	0.10	0.19	0.47
6	0.35	0.13	0.16	0.62
7	0.23	0.10	0.17	0.68
8	0.23	0.10	0.17	0.49
9	0.21	0.10	0.13	0.40
10	0.26	0.10	0.19	0.45
11	0.29	0.10	0.20	0.53
12	0.24	0.10	0.17	0.52
Promedio	0.25	0.10	0.18	0.50
D.E.	0.036	0.08	0.037	0.081

Los datos del presente estudio muestran que tanto las características físicas como las químicas estudiadas son diferentes en las diferentes harinas de maíz nixtamalizado lo cual puede reducir la eficiencia de programas de fortificación con vitaminas y minerales que se desee implementar. Es posible que la variabilidad sea debido a variedad de maíz, sin embargo es más probable que sea debido a variaciones en el proceso de nixtamalización. El nivel de cal y el tiempo de cocción pueden por ejemplo afectar el contenido de ácido fólico y también el de calcio, como ya fuera indicado. El lavado del nixtamal puede afectar fácilmente el nivel de calcio así como el nivel de fibra dietética y el pH del producto final. El pH, el contenido de calcio, el de ácido fólico y el de fibra dietética pueden fácilmente afectar la biodisponibilidad del hierro como ya ha sido establecido (15,16,21).

Es importante por consiguiente establecer niveles apropiados de contenido de compuestos en el maíz nixtamalizado, tanto nutrientes como sustancias antifisiológicas para que sean más exitosos los programas de fortificación de alimentos con vitaminas y minerales y hacer de la tortilla un alimento de superior calidad nutricional.

REFERENCIAS

- Bressani R. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Revs Intal.* 1990;6: 225-264.
- Gómez MH, LW Rooney, RD Waniska & RL Pflugfelder. Dry corn masa flours for tortilla and snack food production. *Cereal Foods World* 1987;32: 372-377.
- Bedolla S, & LW Rooney. Characteristics of U.S. and Mexican instant maize flours for tortilla and snack preparation. *Cereal Foods World* 1984;29: 732-735.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis Centennial Edition (14th, 1984) Washington, DC.
- Anderson RH, HF Conway, VF Pfeifer & EL Griffin Jr. Gelatinization of corn grits by roll- and extrusion-cooking. *Cereal Science Today* 1969;14: 4-7; 11-12.
- Haug W & HJ Lantzsch. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and products. *J Sci Food Agric.* 1983;34: 1423-1426.
- Narasinga Rao BS & T Prabhavathi. An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods. *Amer J Clin Nut.* 1978;31:169-175.
- Englyst HN and Cummings JH. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant food. *J Assoc Off Anal Chem.* 1988;71:808-814.
- Saldana G & HE Brown. Nutritional composition of corn and flour tortillas. *J Food Sci.* 1984;49: 1202-1203.
- Bressani R, M Breuner & MA Ortiz. Contenido de fibra ácido y neutro detergente y de minerales menores en maíz y su tortilla. *Arch Latinoame Nutr* 1989;39: 382-391.
- INCAP-ICNND. Tablas de Composición de Alimentos para Uso en América Latina. INCAP, Guatemala, 1961.
- Bressani R, V Benavides, E Acevedo y MA Ortiz. Changes in selected nutrient content and in protein content and in protein quality of common and quality protein maize during rural tortilla preparation. *Cereal Chem* 1990;67: 515-518.
- Sánchez - Castillo CP, PJS Dewey, M de L Solano, M Rucker & WPT James. The non starch polysaccharides in Mexican Pulses and Cereal Product. *J Fd Comp & Anal.* 1994;7:260-281, 1994.
- Serna - Saldivar SO, DA Knabe, LW Rooney, TD Tanksley & AM Sproule. Nutritional value of sorghum and medize tortillas. *J Cereal Science* 1988;7:83-94.
- Reinhold JG and JS García. Fiber maize tortilla. *Am J Clin Nutr* 1979;32: 1326-1328.
- Reinhold JG, PM García & P Garzon. Solubility of ferrous and ferric ion as affected by constituents of the maize tortilla. *Nut Rep Intal.* 1984;30: 603-615.
- Poneros AG, JW Erdman, Jr. Bioavailability of calcium from tofu, tortillas, dry milk and mozzarella cheese in rats. Effect of supplemental ascorbic acid. *J Food Sci.* 1988;53: 208-210.
- Urizar Hernández AL & R Bressani. Efecto de la nixtamalización del maíz sobre el contenido de ácido fólico, calcio y hierro total y disponible. *Arch Latinoamer Nutr* 1997;47: 217-223.
- Khan N, R Zaman & M Elahi. Effect of heat treatment on the phytic acid content of maize products. *J Sci Food Agric.* 1991;54: 153-156.
- Wyatt CJ & A Triana-Tejas. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca and Phytates in foods commonly consumed in Northern Mexico. *J Agric Food Chem.* 1994;42: 2204-2209.
- Martínez-Torres C, Taylor I Leets, E Tropper, J Ramírez & M Layrisse. Iron absorption from maize bread. *Food Nutr Bull.* 1987;9:62-64.

Recibido: 10-12-1999

Aceptado: 07-08-2001

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 (1977) 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.

Mecanografíese el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 280 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos 25mm (ALAN prefiere la medida de 216 x 280 mm). Escríbase o imprímase solamente sobre una cara del papel. Utilícese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

Página del título

La primera página contendrá: 1) el título del artículo, que será conciso pero informativo; 2) nombre de pila preferido y apellidos de cada autor, acompañados de sus grados académicos más importantes y su afiliación institucional; 3) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; 4) declaraciones de descargo de responsabilidad, si las hay; 5) nombre y dirección del autor que se ocupará de la correspondencia relativa al manuscrito; 6) nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todo ello; y 8) título abreviado (titulillo) que no pase de 40 pulsaciones (contando caracteres y espacios), el cual se colocará, debidamente identificado como tal, en la última línea de la página inicial.

Autoría

Todas las personas designadas como autores habrán de cumplir con ciertos requisitos para tener derecho a la autoría. Cada autor

(1) Requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas. Rev Panam Salud Pública. Pan-Am J Pub Health. 1998;3(3):188-1996.

debe haber participado en el trabajo en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido. Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores. Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

Cada vez es más común que los ensayos multicéntricos se atribuyan a un autor corporativo. Todos los miembros del grupo que sean designados como autores, ya sea en la línea destinada al nombre de los autores a continuación del título o en una nota a pie de página, deberán cumplir plenamente con los requisitos de requisitos de autoría recién señalados. Los miembros del grupo que no cumplan con dichos criterios serán mencionados, con su autorización, en la sección de agradecimientos o en un apéndice (véase "Agradecimientos").

El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de estos. Como los autores se suelen enumerar de distintas maneras, el significado del orden en que aparecen no puede deducirse con exactitud a menos que ellos mismos lo enuncien explícitamente. Para tal efecto, tal vez deseen agregar, en una nota a pie de página, la explicación sobre el orden de enumeración. Al decidir acerca de dicho orden, los autores tendrán presente que muchas revistas imponen un límite al número de autores que figuran en el índice de materias y que, cuando hay más de 25 autores, la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos incluye en MEDLINE tan solo los nombres de los 24 primeros más el del último.

Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporciónense 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, Tolheim BG. Enforcement of data protection, privacy

and security in medical informatics. En: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. Informe científico o técnico

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora: Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:

Field MjJ Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. Tesis doctoral

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

24. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.

Otros trabajos publicados

25. Artículo de periódico

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. Documentos legales

Ley pública:
Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:
Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1 st Sess. (1995).

Código de normas federales:
Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

28. Mapa

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. Libro de la Biblia

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. Diccionarios y obras de consulta semejantes

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. Obras clásicas

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Trabajos inéditos**32. En prensa**

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

Material en soporte electrónico**33. Artículo de revista en formato electrónico**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 51;1(1):{24 pantallas}. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

34. Monografía en formato electrónico

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

35. Fichero de computadora

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Cuadros

Mecanografía o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, 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.) O sus múltiplos y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Envío del manuscrito a la revista

Envíe por correo el número requerido de copias del manuscrito en un sobre de papel resistente; si es necesario, proteja las copias y las figuras metiéndolas entre dos hojas de cartón para evitar que las fotografías se doblen. Meta las fotografías y transparencias en su propio sobre de papel resistente.

Los manuscritos irán acompañados de una carta de envío firmada por todos los coautores.

Fuerte como un roble.

Ahora tus cereales Kellogg's®
vienen con Forticalcio®,
todas las fortalezas del calcio
para huesos y dientes
sumamente fuertes.



FORTICALCIO® de *Kellogg's*®

Más fortalezas para crecer.
www.kelloggs-latino.com

**En Venezuela y hacia y desde todo el mundo,
en IPOSTEL le ofrecemos**

**SERVICIOS TRADICIONALES de Cartas, Impresos y
Encomiendas.**



... y además contamos con novedosos

SERVICIOS EXPRESOS



A nivel nacional ofrecemos: EEE (Entrega Especial Expresa) es un servicio que le permite enviar documentos y encomiendas a todo el Territorio del país de una forma expresa, económica y segura.



EMS, (Express Mail Service), es un servicio tipo courier que le permite enviar documentos y mercaderías a nivel internacional, respondiendo a su necesidad de entrega en tiempo breve y a los precios más económicos del mercado.

SERVICIOS ELECTRONICOS

CORREO ELECTRONICO Y KIOSCO INTERNET

Ipostel habilitó para aquellos usuarios que les gusta navegar en el mundo de la red, kioscos de internet, ubicados en Altamira, C.C.C.T y los Ruices, los cuales disponen de computadoras de fácil acceso a todas aquellas personas interesadas en explorar dentro del campo de la comunicación.



AUTOMATIZACION DE TAQUILLA

La automatización de taquillas cuenta con modernos accesorios como balanza electrónica e impresora de recibos; esta permite mejorar la atención en las taquillas postales y simultáneamente establecer un control eléctrico de los ingresos por venta de servicios.



SEGURIDAD Y RASTREO POR CODIGO DE BARRA

El Código de barra permite registrar los datos más importantes de los envíos EMS entrantes y salientes, este sistema actualmente es utilizado a nivel internacional, para envíos EMS.



Un Mundo de Servicios para Usted...

Artes Finales: Amerik Solutions C.A., Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 993.81.43

Portada: Chávez & López, Diseño Gráfico, Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 285.55.29

Impresión: Editorial Texto C.A., Caracas, Venezuela
Teléfonos (02) 62.24.85 - 62.87.30

SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICION (SLAN)

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN) fue creada el 10 de Noviembre de 1965 en ocasión de celebrarse el Primer Congreso de Nutrición del Hemisferio Occidental. El actual Consejo Directivo de la SLAN (2001-2003) está constituido por los siguientes miembros:

Presidente	Adolfo Chávez
Vicepresidente (Presidente Electo)	Helio Vannucchi
Secretario General	Abelardo Avila Curiel
Tesorero	Fernando Pérez-Gil Romo
Presidente Saliente	Alejandro O'Donnell
Vocal de Salud Pública	Juan Rivera Dommarco
Vocal de Alimentación y Dietética	Consuelo Velásquez
Vocal de Nutrición Infantil	Homero Martínez
Vocal de Ciencia de los Alimentos	Jóse Angel Ledesma Solano
Vocal de Tecnología de Alimentos	Eduardo Mendoza Martínez
Vocal en Nutrición Básica	Salvador Villalpando
Vocal en Nutrición Animal	Silvia Carrillo
Vocal en Estatutos y Organización	Natalia Berún de Tamez
Vocales de Informática	Teresa Shamah Levy
	José Félix Chávez Pérez (ALAN)
	Héctor Araya (AEN)
Vocales de Congreso y Reuniones	Miriam Muñoz Rivera
	Mara Rosa Ochoa Camposeco
	Claudia Hunot
	María Concepción Sánchez Roveló

DIRECTORIO DE ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION

Editor General	José Félix Chávez Pérez
Editor Asociado	Maritza L. de Jiménez

MIEMBROS DE CUERPO EDITORIAL PERIODO 2001-2003

Juan de Dios Alvarado	María L.P. Martín de Portela
Héctor Araya	Lilia Masson Salaué
María Laura Arias E.	Reynaldo Martorell
Jaime Ariza M.	Rafael Monge R.
Guillermo Arroyave	Josefina Morales de León
José María Bengoa	Santiago Muzzo B.
Adriana Blanco M.	Rosa María Ortega A.
Héctor Bourges R.	Saturnino de Pablo
Ricardo Bressani	Nelly Pak
Jesús Bulux	Emma W. de Penna
Benjamín Caballero	Ernesto Pollitt
Germán Camejo	Myriam Puig A.
Sara J. Closa	María Ester Río
Omar Dary M.	María Elena Sambucetti
Elizabet Dini G.	Nilson E. de Sousa
J.E. Dutra de Oliveira	Nora Slobodianik
Juan Ignacio Egaña	Liseti Solano R.
Patricia R. de Ferrer	Noel W. Solomons
María N. García Casal	Luiz C. Trugo
Marisa Guerra M.	Ricardo Uauy D.
Werner G. Jaffé	Mirtha E. Valencia
Gladys Henríquez P.	Mauro Valencia J.
Eva Hertrampf	Yolanda H. de Valera
Patricio Hevia O.	Mario Villarroel T.
Miguel Layrisse	Tomás Walter
Luis López Valladares	Carolyn Jane Wyatt
Julio Sergio Marchini	Enrique Yáñez S.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Volumen 51. N° 3, Septiembre 2001

Contenido

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Nutrición Humana

Absorption of unlabeled reduced iron of small particle size from a commercial source. A method to predict absorption of unlabeled iron compounds in humans

Horacio González, Concepción Mendoza[†] and Fernando E. Viteri 217

Utilização de diferentes concentrações de ferro por adolescentes grávidas também suplementadas com zinco e ácido fólico

Nadir do Nascimento Nogueira, Dilina do Nascimento Marreiro, Joaquim Vaz Parente, Sílvia M. Franciscato Cozzolino 225

Growth and hematological studies on Brazilian children of low socioeconomic level

Carlos A. Nogueira-de-Almeida, Rubens G. Ricco, Luiz A. Del Ciampo, Ana Maria de Souza, José Eduardo Dutra-de-Oliveira 230

Serum lipids and lipoprotein levels in Costa Rican 13-18 year-old teenagers

Rafael Monge-Rojas 236

Bioquímica Nutricional

Absorción de grasa proveniente de tres fuentes dietarias en ratas con diarrea inducida con lactosa

González E.G. Sanchez G., Cioccia A.M., Hevia, P. 244

Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats

Egle M.A. Siqueira, Sandra F. Arruda, Lucilene M. de Sousa and Elizabeth M.T. de Souza 250

Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina

Rosimar Regina da Silva, Tânia Toledo de Oliveira, Tanus Jorge Nagem, Aloísio da Silva Pinto, Luiz Fernando Teixeira Albino, Márcia Rogéria de Almeida, George Henrique Kling de Moraes, José Geraldo Pinto 258

Maillard's reaction in parenteral solutions supplemented with arginine

M. R. C. G. Novaes, L. A. M. Lima, M. V. Sousa 265

Ciencia de Alimentos

Changes in protein fractions, trypsin inhibitor and proteolytic activity in the cotyledons of germinating chickpea

Valdir Augusto Neves and Euclides Joaquim Lourenço 269

O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiase e verbascose

Admar Costa de Oliveira, Keila da Silva Queiroz, Elizabeth Helbig, Soely Maria Pissini Machado Reis, Francisco Carraro 276

Actividad ureásica en productos de soja. Propuesta de un nuevo método

M.C. Olguin, M.I. Zingale, G.C. Revelant, M.E. Vignale 284

Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark

Elizabeth Lemos Chicourel, Alice M. Sakuma, Odair Zenebon, Alfredo Tenuta-Filho 288

Tecnología de Alimentos

Fortificación y evaluación de tortillas de nixtamal

Juan de Dios Figueroa Cárdenas, María Guadalupe Acero Godinez, Nora Lilia Vasco Méndez, Alejandro Lozano Guzmán, Luz María Flores Acosta y Jesús González-Hernández 293

Mezclas legumbre/cereal por fritura profunda de maíz amarillo y de tres cultivares de frejol para consumo "snack"

María Luz Hurtado P., Berta Escobar A. y Ana María Estévez A. 303

LatinFoods. Composición de Alimentos

Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central

Ricardo Bressani, Juan C. Turcios, Luis Reyes y Roberta Mérida 309

INFORMACION PARA LOS AUTORES 314