

ALAN

Volumen 45. N° 4. Diciembre 1.995

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*).

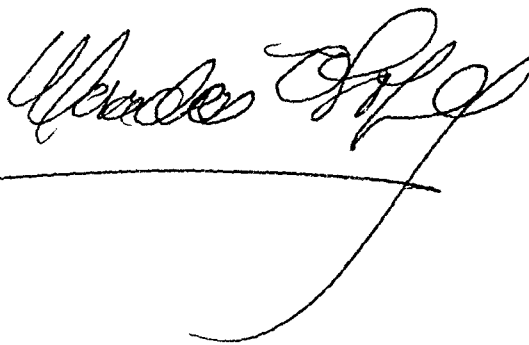
Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN) is the official publication of the Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), for the dissemination of knowledge in the fields of food and nutrition, principally throughout the American Hemisphere. Articles in Spanish, English, Portuguese and French are 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.
Avenida Francisco de Miranda
Caracas 1060. Venezuela, S.A.
Fax (58-2) 284.85.43

ENTIDADES PATROCINANTES

- **Fundación CAVENDES**
Caracas, Venezuela
- **Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)**
Guatemala, Guatemala C.A.
- **KELLOGG'S América Latina**
- **Protein Technologies International**
Caracas, Venezuela
- **CONICIT. Venezuela**
-  **PRODUCTOS ROCHE. América Latina**
- **Fundación POLAR**
- **Alimentos HEINZ**
- **INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION. Venezuela**
- **Alimentos LE BISCUIT C.A.**
- **PARMALAT de Venezuela**



Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 45

DICIEMBRE 1995

Nº 4

Contenido

	Páginas
EDITORIAL	257
ARTICULOS GENERALES	
Defining cooking salt intakes for patient counselling and policy making Claudia P. Sánchez-Castillo and W. Philip T. James.....	259
Pasado y presente en el diseño de fórmulas infantiles Patricia Ana Ronayne de Ferrer.....	265
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Nutrición Humana	
Desarrollo de un programa para la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad por ordenador Ma. Carmen Rodríguez, Ignacio Coupeau, Jesús Larralde , y Alfredo Martínez J.....	274
Indicadores braquiales de grasa y músculo de escolares de una comunidad rural según el grupo social (General Lavalle, Buenos Aires, Argentina) Andrés Guillermo Bolzán y Luis Manuel Guimarey	281

Biochemical Nutrition

Changes of serum lipids in vitamin K3 (menadione) treated rats

Alarcón O.M., Reinoso F.A., Silva L., T.M., Padrón F., A..... 286

Influence of intake of vegetable oils on the *in vitro* intestinal absorption of glucose in golden hamster

Iris GonzálezBarra, Marcela Escobar and Mauricio Villarroel Guerra..... 290

Polyunsaturated fatty acid deficiencies: effects on hepatic plasma membrane fatty acid composition and enzyme activity

Angulo G.O..... 295

Interaction of vitamin A and zinc in lactating rats. Experimental deficiency model

Lucia Kiyoko Ozaki Yuyama and Silvia Maria Franciscato Cozzolino..... 305

Food Science

Extraction, purification and some partial characterization of α -amylase inhibitors from wheat Iapar 28-Igapó

Neide Kiyoko Kondo, Elza Iouko Ida..... 310

Proteolytic activity control in fish silage

Tomé Elisabetta, Levy Benshimol Abraham, Bello Rafael Antonio..... 317

Food Technology

The use of industrial defatted corn germ in breadmaking

Marisela Granito, Marisa Guerra..... 322

Development of an intermediate moisture product based on texturized soy protein for the elderly people

Josefina C. Morales de León, Patricia Cecin Salomón and Ma. de la Luz Crail Chávez..... 329

LatinFood: Food Composition

Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (*Eriobotrya japonica Lindl.*)

Helena T. Godoy, and Delia B. Rodriguez Amaya..... 336

NOTES..... 340

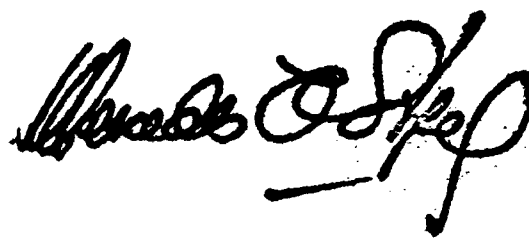
NEW BOOKS..... 343

INFORMATION TO AUTHORS..... 347

GENERAL INDEX OF VOLUMEN 45, 1995..... 350

AUTHOR INDEX..... 354

SUBJECT INDEX..... 360



Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 45

DECEMBER 1995

Nº 4

Contents

	Pages
EDITORIAL	257
GENERAL ARTICLES	
Defining cooking salt intakes for patient counselling and policy making Claudia P. Sánchez-Castillo and W. Philip T. James.....	259
Past and present status in the design of infant formulas Patricia Ana Ronayne de Ferrer.....	265
RESEARCH PAPERS	
Human Nutrition	
Development of a computer program to assess infant nutritional status Ma. Carmen Rodríguez, Ignacio Coupeau, Jesús Larralde, and Alfredo Martínez J.....	274
Brachial indicators of fat and muscle in a rural community according to social groups. (General Lavalle, Bs. As. Argentina) Andrés Guillermo Bolzán and Luis Manuel Guimarey.....	281

Biochemical Nutrition

Changes of serum lipids in vitamin K3 (menadione) treated rats Alarcón O.M., Reinoso F.A., Silva L., T.M., Padrón F., A.....	286
Influence of intake of vegetable oils on the <i>in vitro</i> intestinal absorption of glucose in golden hamster Iris GonzálezBarra, Marcela Escobar and Mauricio Villarroel Guerra.....	290
Polyunsaturated fatty acid deficiencies: effects on hepatic plasma membrane fatty acid composition and enzyme activity Angulo G.O.....	295
Interaction of vitamin A and zinc in lactating rats. Experimental deficiency model Lucia Kiyoko Ozaki Yuyama and Silvia Maria Franciscato Cozzolino.....	305

Food Science

Extraction, purification and some partial characterization of α-amylase inhibitors from wheat Iapar 28-Igapó Neide Kiyoko Kondo, Elza Louko Ida.....	310
Proteolytic activity control in fish silage Tomé Elisabetta, Levy Benschimol Abraham, Bello Rafael Antonio.....	317

Food Technology

The use of industrial defatted corn germ in breadmaking Marisela Granito, Marisa Guerra.....	322
Development of an intermediate moisture product based on texturized soy protein for the elderly people Josefina C. Morales de León, Patricia Cecin Salomón and Ma. de la Luz Crail Chávez.....	329

LatinFood: Food Composition

Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.) Helena T. Godoy, and Delia B. Rodriguez Amaya.....	336
---	-----

NOTES.....	340
NEW BOOKS.....	343
INFORMATION TO AUTHORS.....	347
GENERAL INDEX OF VOLUMEN 45, 1995.....	350
AUTHOR INDEX.....	354
SUBJECT INDEX.....	360

Editorial

DATOS DE COMPOSICION QUIMICA DE ALIMENTOS

Cada día es mayor la necesidad de contar con información actualizada y confiable sobre la composición química de los alimentos. Esta información es vital no sólo por su estrecha relación con la implementación de políticas en nutrición de los países sino también para el buen desarrollo del comercio internacional de alimentos. Esto exige que esta información, vertida generalmente en tablas de composición de alimentos, sea de amplia cobertura incluyendo en lo posible el máximo de los componentes presentes en los alimentos. Cabe destacar que un altísimo porcentaje de los alimentos que son comercializados internacionalmente son producidos en países en desarrollo o subdesarrollados y son destinados a los grandes centros comerciales de los países desarrollados quienes a su vez deben satisfacer las demandas de información nutricional de sus consumidores que se caracterizan por un alto grado de conocimiento. El etiquetado nutricional implementado en estos países es una demostración de esta situación. Coincidentemente en los países en desarrollo existe un notorio atraso en cuanto a la actualización de sus tablas de composición de alimentos. Por esta razón, en marzo de 1994 se llevó a cabo en Túnez una reunión sobre Datos de Composición de Alimentos para Países en Desarrollo la cual fue organizada por FAO/UNU con el objeto de discutir estrategias para darle un mayor impulso a la composición de alimentos en estos países. Un hecho importante fue la posición de FAO de colaborar activamente en este tema, del cual se había alejado por algunas décadas, en conjunto con la Universidad de las Naciones Unidas, UNU, a través de su proyecto INFOODS (International Network of Food Data Systems).

Dentro de las conclusiones de esta reunión se designaron dos Centros Subregionales de INFOODS para América Latina con la misión de coordinar las actividades de composición de alimentos en la región, uno con sede en INTA, Chile, responsable para Sudamérica y el segundo con sede en INCAP, Guatemala. Ambos Centros fueron incorporados a la estructura de LATINFOODS en el Simposio sobre LATINFOODS dentro del marco del X Congreso Latinoamericano de Nutrición de la SLAN realizado en Caracas en noviembre de 1994. En dicha ocasión el Dr. Ricardo Bressani, presidente de LATINFOODS informó de la nueva estructura de LATINFOODS la cual fue posteriormente difundida en ALAN.

La primera gran actividad del Centro Subregional LATINFOODS, Chile, fue organizar en conjunto con la Dirección de Alimentación y Nutrición de la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe y con el patrocinio de la Universidad de las Naciones Unidas, el **Taller CTPD sobre Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición** el cual se realizó en el INTA del 9 al 27 de octubre de 1995 y al cual asistieron 23 profesionales provenientes de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, México, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela, quienes representaban a las instituciones de sus países involucradas con la creación de las tablas de composición.

Los objetivos de este Taller fueron: -Unificar criterios sobre la generación, validación y el manejo de datos analíticos de los componentes de los alimentos para promover el desarrollo de nuevas Tablas nacionales y regionales de composición química de alimentos y para la formación de una base de datos LATINFOODS; -Diseñar actividades de seguimiento a nivel de los países, en relación a la producción y manejo de datos de composición química de los alimentos; y, -Fomentar el trabajo armónico y colaborativo entre analistas, compiladores y usuarios, de manera de contribuir a mejorar la calidad de información nutricional para beneficio de la salud y economía de nuestros países.

En el Taller participaron como docentes destacados expertos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA), de INFOODS, Nueva Zelanda, de las casas matrices de Roche y Nestlé en Suiza y académicos de distintas universidades de países sudamericanos. El programa abarcó todos los niveles relacionados en la composición de alimentos: usuarios, analistas y compiladores siguiendo las pautas de un curso similar que dicta cada dos años desde 1992 la Universidad de Wageningen de los Países Bajos también bajo el auspicio de la UNU.

Los logros más significativos del Taller fueron:

1. El compromiso de disponer de una nueva tabla de composición de alimentos en versión electrónica para los países sudamericanos para diciembre de 1996. Se acordó el formato de la nueva tabla, los componentes a incluir, los plazos de recolección de datos en los países, de envío de la información al Centro Subregional y de elaboración de la tabla por parte de éste.
2. Se dio inicio al primer estudio intercolaborativo utilizando muestras comerciales y estándares de referencia el cual está en pleno proceso de avance y cuyos resultados deben ser publicados durante 1996.
3. En conjunto con la Dirección de Alimentación y Nutrición de la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe se elaboró el documento «Informe del Taller CTPD sobre Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición» el cual ya ha sido publicado como documento FAO (RLAC/9518-NUT-60). Este documento es una valiosa pieza de información al cual contribuyeron los participantes del Taller con la información de los recursos humanos e infraestructura de su países y además contiene las estrategias para impulsar la composición de alimentos a nivel regional junto con las conclusiones y recomendaciones del Taller.

Estamos ciertos que el Taller cumplió ampliamente con sus objetivos. Creemos que ha contribuido significativamente a rehacernos el compromiso con la composición de alimentos en nuestros países más allá de nuestras limitaciones materiales. Sentimos que disponemos de una nueva oportunidad de retomar este esfuerzo que había decaído por distintas razones, entre otras porque nos sentíamos aislados. El Taller sirvió para ratificar que tenemos problemas comunes pero que unidos los podemos enfrentar exitosamente. No dejemos pasar esta oportunidad de actuar en conjunto y apoyarnos entre nosotros para lograr el objetivo de tener una nueva tabla de composición de alimentos.

Dr. Saturnino de Pablo
INTA. Santiago, Chile

Defining cooking salt intakes for patient counselling and policy making

Claudia P. Sánchez-Castillo¹ and W. Philip T. James²

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán y The Rowett Research Institute, Greenburn,
Road, Bucksburn, Great Britain.

SUMMARY. The role of salt (NaCl) in the development of high blood pressure has been a matter of debate, however, the Intersalt Study showed that sodium (Na) intake in various areas of the World is related to the slope of blood pressure with age. Accurate amounts of the total salt intake or that coming from a particular source are needed, both, for physicians who need to consider the salt intake of their patients and for public health workers who are in charge of the implementation of public health programs where salt is used as a carrier of other nutrients. An analysis of the literature suggests that exaggerated values for total salt intakes have often been obtained from indirect estimates; discretionary salt use, i.e. home-cooking salt has invariably been overestimated. A method is described for measuring the contribution of cooking salt to total salt intake since it is a confusing area where inappropriate methods have been used to assess its contribution. The method described is based on the use of small amounts of lithium carbonate fused with NaCl. Validation experiments were undertaken to determine the naturally occurring lithium (Li) in a number of foods including fresh, frozen and tinned vegetables, and the use of Li tagged salt for cooking vegetables and for direct use in cooked foods. We also assessed whether Li was taken up proportionally with Na into foods during cooking. In general vegetables contained variable but only small amounts of Li except aubergine and spinach, and Li was taken up proportionally with Na in a variety of vegetables. Results showed that 36,35 and 21% of the salt added during cooking was recovered in carrots, runner beans and potatoes respectively, the rest being discarded in the cooking water. This suggests that about a third of salt added during the cooking of vegetables will be ingested by the household. Attempts to rely simply on the total use of household salt supplies will clearly exaggerate, markedly, the true intake of individuals.

Key words: Salt, cooking, intake, policies, advice, patients.

RESUMEN. Cómo se valora el consumo de sal de cocina para dar consejo a pacientes y definir políticas de consumo. El papel de la sal (NaCl) en el desarrollo de la hipertensión arterial ha sido un área de mucho debate, sin embargo el estudio Intersalt demostró que, en varias partes del mundo, la ingestión del ión Na está correlacionada con las cifras de tensión arterial según la edad. Es necesario valorar con exactitud tanto la ingestión total de sal así como aquella que proviene de una fuente particular, i.e. fuentes discrecionales (sal de mesa y de cocina) y no discrecionales (sal de productos procesados, agua, etc). Esta información facilitará la orientación al paciente por parte del médico en cuanto a la fuente de sal que debe restringir, y los encargados de implementar políticas de salud, podrán decidir con mayor precisión, los programas de salud pública en los que la sal se usa como vehículo de otros nutrimentos. El análisis de la literatura sugiere que se han obtenido frecuentemente valores exagerados de cifras de ingestión de sal cuando esta se evalúa con métodos indirectos, i.e. el uso de sal de cocina en el hogar, que siempre se ha sobreestimado. Aquí se describe un método basado en el uso de pequeñas cantidades de carbonato de litio mezclado (en fusión a 800°C) con NaCl. Se llevaron a cabo experimentos de validación para determinar la cantidad natural de litio (Li) de una variedad de vegetales frescos, congelados y enlatados; el uso de esta sal marcada con Li para cocinar vegetales, así como su uso directo en alimentos cocinados. Se valoró si el Li era absorbido proporcionalmente con el Na en los alimentos durante la cocción. Los resultados mostraron que, en general, los vegetales contenían cantidades variables pero pequeñas de Li, excepto la berenjena y la espinaca, y el Li y el Na difundieron proporcionalmente en los vegetales. De la sal añadida durante la cocción sólo el 36,35 y 21% fue absorbida en zanahorias, ejotes y papas respectivamente, el resto fue descartado junto con el agua de cocción. Esto sugiere que solo, un tercio de la sal que se añade durante la cocción de los vegetales será ingerida en el hogar. Valorar la ingestión de sal y sus fuentes basados simplemente en la compra o el uso total de sal en la familia, claramente exagera, de forma muy marcada, la ingestión verdadera de sal de los individuos.

Palabras claves: sal, cocina, consumo, políticas, consejo, pacientes.

1 Investigadora Titular, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México.

2 Director. The Rowett Research Institute, U.K.

INTRODUCTION

Salt intake has been linked to the development of hypertension which is a risk factor for both coronary heart disease (CHD) and stroke. The dangers of high salt consumption have been reported extensively; they are backed by a great deal of experimental work in animals as well as evidence in man (1-10). The Intersalt study showed that sodium intake in various areas of the World is related to the slope of blood pressure with age, even after adjusting for body weight and alcohol consumption (11). In parts of Mexico the prevalences of hypertension are as high as 27% (12) and, according to official statistics, CHD is now becoming the leading cause of death among the adult population (13). It is therefore important to establish what the salt intake is in Mexico and its sources. Discretionary use of salt is that salt used by households in cooking or at the table, whereas non-discretionary salt includes that added in processing to the naturally occurring salt of the food itself. If an accurate assessment of these contributors can be made then public health workers will be in a position to give appropriate advice to the public on the most suitable way of reducing its salt intake and to identify the major sources of salt used in manufacture so that steps can be taken to persuade the industry to change their processing methods.

Accurate assessments of total salt intake or that coming from a particular source, e.g. cooking salt, are also needed for the implementation of public health programs where salt is used as carrier of other nutrients. Thus a salt iodine mixture has been used for many years to prevent certain types of goiter. Domestic salt has also been used as a carrier of fluoride for preventing dental caries (14). Other programs have used chloroquine or pyrimethamine salt mixtures as a suppressive against sporozoite induced vivax malaria (15). If this is to continue, then the quantitative significance of the salt source must be known so that any planned reductions can be accompanied by complementary increases in the nutrient or drug supplement.

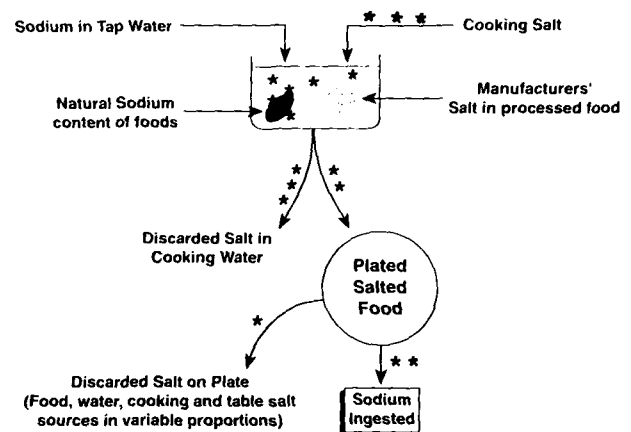
Physicians who manage patients with hypertension also need to consider the salt intakes of their patients. Unfortunately most of them currently ignore the dietetic issues in hypertension management because it seems simpler to use drugs. Given the increasingly recognized hazards of drug therapy and the established value of dietary interventions (16) it now becomes important to identify how best to help patients by dietary means. In this paper we highlight the issue of cooking salt as a contributor to total salt intake because it is a confusing area where inappropriate methods have been used to assess its contribution.

Assessment of cooking salt: The assessment of cooking salt intake by an individual or population has always been looked upon as something very complex and tedious. Its accurate measurement usually required the analysis of pre-cooked and cooked foods, together with separate estimates of

the sodium in tap water. Some investigators assumed that a great deal of cooking salt was discarded in cooking water; to check this entails the use of duplicate weighed samples of food eaten by the individual as well as monitoring food leftovers. Only then could the actual amount of cooking salt eaten be measured.

We proposed some years ago a new approach to evaluating cooking salt intake using lithium labelled salt (17). The tracer lithium was expected to track the sodium through the cooking and eating process and then to be absorbed and recovered in the urine. If lithium could be measured easily in the urine it should, from a knowledge of the background urinary recovery of ingested lithium and knowing the proportions of lithium in the tagged cooking salt, be possible to calculate the actual amount of cooking salt eaten. This method therefore avoided all the tedious analyses required in the traditional approach. The principles of the technique are shown in Fig. 1.

FIGURE 1
The tracking of cooking salt consumption



Cooking salt has been labelled with lithium which will make its way, in proportion to the sodium, into the food being cooked. Some of the lithium will be discarded in the cooking water whilst the rest will be ingested or discarded on the plate.

Several steps were needed to approach the validation of the new technique with scientific rigour. A method of food digestion was required to determine the naturally occurring lithium in a number of foods. This was important because if foods contain a great deal of lithium then a small amount of tracer Li could not be used in the tagged salt source. A validation procedure was also needed to ensure that lithium penetrated into vegetables at a rate equivalent, on a molar ratio basis, to that of sodium. The validity and reproducibility of lithium and sodium uptake by vegetables had also to be assessed. The validity of using Li tagged salt for cooking vegetables and for direct use in cooked foods then had to be checked to ensure that whatever the route of use of the Li

tagged cooking salt the Li was released once the food was eaten. This required a metabolic study where the amounts of cooking salt added to cooking vegetables and to other ingredients was known accurately and where the recovery of ingested Li could be meticulously monitored by collecting urine, faeces and sweat.

Finally we sought to compare the estimates of cooking salt consumption derived from a simple weighing method in the home with the new specific Li tracking technique. An epidemiological study was needed for this approach.

This paper therefore provides an overview of these studies and proposes some simplification of the technique which allow a coherent line of research on sodium intake to be developed in Mexico.

METHODS

The lithium content of foods and lithium uptake in cooking:

The lithium content of a number of foods including fresh, frozen and tinned vegetables, was measured. All three types of prepared vegetables were washed in deionized water, cut into small pieces and weighed before freeze-drying for several days. The samples were re-weighed, ground to a fine mixture and digested in concentrated nitric acid in acid washed pyrex crystal tubes before being measured for their Li content.

Two different digestion methods were compared in order to test for any differences in the extraction of lithium from foods. The importance of totally digesting food samples in heated concentrated nitric acid was compared with a partial digestion method using 1M nitric acid without heating for 12 hours. Raw cabbage, raw peeled potatoes and the peel of the potatoes were chosen for the experiment. After digestion and dilution with deionized water the Li content of the solution was measured by flame photometry in a Pye Unicam spectrophotometre.

Cooking experiments were conducted to investigate whether there was equivalent penetration of lithium and sodium into vegetables. Two vegetables, potatoes and cabbage were assessed in duplicate with their Li and Na content being measured before as well as after cooking. By measuring the volume of water used, the weight of cooking salt added and the final partition of Li and Na between the water and vegetables, it was possible to assess both total recoveries of Li and Na and whether the molar ratio Na/Li had been maintained as the elements penetrated the vegetables.

Metabolic and epidemiological studies: The use of lithium-labelled cooking salt was then tested both in a controlled study where defined quantities of labelled cooking salt were given to five volunteers in a metabolic ward for a period of 6 days and in an epidemiological study where *ad libitum* use of cooking salt was allowed. Details of the controlled metabolic study are given elsewhere (18) and other aspects of the

epidemiological study have also been described (19).

In the metabolic study the vegetables for each of the volunteers were prepared in batches two or three days before the start of the metabolic experiment. An extra amount was also prepared to allow for samples to be taken for duplicate analysis. Four cooking sessions were necessary to prepare the vegetables for five volunteers. Vegetables were weight into individual portions after being cooked and they were then stored at -20°C in the long-term freezer until needed.

The quantities of vegetables (0.5-6.5 kg), volume of water (1-13 L) and grams of salt (2.9-37.7 g) used in the cooking of labelled and unlabelled vegetables were substantial. The Li and Na content of all components were assessed at the end of the cooking time which varied depending on the vegetable involved. Li tagged salt was also added directly to several foods being prepared for cooking ie. jam tarts, omelette and gravy. This was to test the recovery of Li added to foods as distinct from those where Li occurred naturally. By Knowing the Li + Na content of the cooked vegetables and the absolute amount of tagged salt added to specific food items it was possible to estimate total Li and Na intake and then see how well these could be recovered in urine, faecal and sweat collections.

Finally, the study of cooking salt use was taken into an epidemiological context by using the tagged cooking salt for a one week period. The lithium cooking salt was tested in 83 free living adults from 54 households in a small market town in Cambridshire England. The 54 index cases were randomly selected from the age/sex register of a medical practice and 29 of their spouses agreed to take part. In addition to collecting 24h urines for 12 days to assess the Li output the weighed loss of tagged cooking salt was measured. This allows comparisons of the traditional method based on weighing with the new Li specific method.

RESULTS

The total digestion method gave consistently higher lithium values for the potatoes ($p < 0.001$) and their peel ($p < 0.001$) than the partial digestion technique. On the basis of these results, the total digestion method was chosen for assessing the lithium content of foods. The results of the analysis of the Li content of vegetables are given in Table 1. Aubergine and spinach had remarkably high lithium contents but their country of origin was not known. Some care will therefore be needed to check the Li content of Mexican plants if the technique is to be applied in this country.

TABLE 1
THE MEASURED NATURAL LITHIUM CONTENT
OF VEGETABLES *

Vegetables	$\mu\text{mol Li/kg (WW)**}$ Mean \pm SD	$\mu\text{mol Li/kg (DW)}^\circ$ Mean
Heinz baked beans	5.9 \pm 0.6	16.5
Brussel sprouts	3.6	18.0
Cauliflower	1.1	6.1
Spinach	29.3 \pm 0.3	168.0
Broad Beans	2.7 \pm 0.2	10.9
Crosse & Blackwell		
Baked Beans	4.8 \pm 0.2	14.3
Parsnips	2.6 \pm 0.3	9.9
Processed Peas	8.8 \pm 0.7	24.5
Garden Peas	3.4 \pm 0.5	22.3
Green Beans	2.3 \pm 0.3	11.3
Carrots	2.8 \pm 0.8	15.4
Mushrooms	2.9 \pm 0.2	18.9
Aubergines	132.2 \pm 1.8	794.1
Swedes	1.8 \pm 0.3	9.9
Leeks	2.9	16.4
Courgettes	2.9 \pm 0.9	16.4

* Usually a minimum of 3 samples were analysed where an SD value is shown

** Wet Weight

° Dry Weight

Table 2 shows the aggregate results of the recovery of lithium and sodium added to the cooking water in the preliminary study with potatoes and cabbage. Despite the losses of water and the separate analyses of the cooking water and vegetables, good recovery figures for sodium and lithium were obtained varying from 91 to 107%. Table 2 also shows the proportion of the total added Li and Na which had penetrated into the cooked vegetables. Only 15-20% of the added elements was taken up by the potatoes and cabbage. There is a remarkable concordance in the results for Na and Li despite the Na/Li ratio in the added material being approximately 45:1. Confirmation of the proportional penetration of these two elements into the cooked foods is shown in Table 2 where the Li and Na are also expressed as their ratios in both the cooked vegetables and the final cooking water.

TABLE 2
SODIUM AND LITHIUM RECOVERIES AND
VEGETABLE NaCl AND Li PENETRATION DURING
COOKING*

	Total Recoveries		Penetration into vegetables		Na/Li** Molar Ratio Cooked Vegetables	Na/Li** Molar Ratio Cooking Water
	Na (%)	Li (%)	Na (%)	Li (%)		
Potato 1	96.0	90.9	15.4	17.1	53.9	45.7
Potato 2	97.6	96.8	18.4	18.9	48.9	44.0
Cabbage 1	106.6	100.4	20.6	20.5	44.6	48.0
Cabbage 2	96.6	101.6	17.2	15.7	41.0	42.6

* An allowance was made for the lithium and sodium content of the uncooked material by measuring their concentration of Na and Li prior to cooking.

** Na/Li ratio of labelled salt= 44.8

In the first part of the metabolic study the penetration of Li and Na was assessed in 3 different vegetables cooked for very different periods of time (Table 3) and with very different volumes of cooking water. The Mean \pm SD recovery of Na in the batches, of runner beans was 92.5 \pm 4.2%, for the batches of potatoes 95.5 \pm 7% and for the batches of carrots 107.1 \pm 3%. Total lithium recoveries in all batches ranged from 97 to 117% and for sodium the recoveries ranged from 87 to 112%. Similar recoveries were obtained in these batches cooked with unlabelled salt. The Na/Li molar ratios obtained in the twelve batches of vegetables cooked with tagged salt are also shown in Table 3. There was a reasonable similarity in the Na/Li ratio in the vegetable and cooking water despite all the sample manipulation during the preparation and cooking steps. The sampling, analytical and biological variation in the lithium and sodium content of the foods seemed therefore to be small. With a labelled salt having a Na/Li ratio of 73.1 it was noteworthy that the potatoes and runner beans showed a very similar response and that the Na/Li ratio varied from 66-81% which is probably within the error of the experiment given the number of analyses involved. Yet, despite the variation in the length of cooking and the amount of water used, the amount of sodium and lithium that diffused into the potatoes and runner beans were remarkably similar. There was also no evidence of differences in the Na/Li ratio despite a fourfold variation in cooking time.

TABLE 3
TOTAL LITHIUM AND SODIUM RECOVERIES AND
ELEMENTAL RATIOS IN INDIVIDUAL BATCHES OF
VEGETABLES AFTER THEY HAVE BEEN COOKED
FOR A VARIABLE LENGTH OF TIME WITH
LITHIUM-TAGGED SALT

Batch No	Vegetable	Volume Cooking Water (l)	Total Cooking Time (min)	Na (5)	Li (%)	Na/Li Water	Na/Li Vegetable
1	Potatoes	4	37	104	117	57.7	81.3
2	Potatoes	8	63	87	98	61.5	79.3
3	Potatoes	4	35	97	103	68.2	72.9
4	Potatoes	4	41	94	100	68.1	72.2
5	Runner Beans	1	16	87	98	58.4	74.8
6	Runner Beans	2	19	97	100	72.0	69.4
7	Runner Beans	1	14	94	97	69.8	71.6
8	Runner Beans	1	14	92	101	67.4	65.8
9	Carrots	1	17	105	99	69.6	100
10	Carrots	2	19	112	100	75.9	100
11	Carrots	1	17	106	101	71.9	89.4
12	Carrots	1	15	104	102	71.6	83.7

* Labelled salt Na/Li ratio= 73.1

The carrot studies suggested that Na entered this vegetable rather more easily than Li. However, the recoveries of Li and Na from the total study were good and there was no real

evidence of the Na/Li ratio being lower in the cooking water at the end of the study. Thus, with only 36% of the total salt being taken up by the vegetables some other factor could be involved. A small interference in the spectrometric analysis of the Li content of the carrots because of quenching by the carotenoids also present in the carrots would lead to an underestimation of the lithium content of carrots. This in turn would give the observed Na/Li ratios in the water, but higher ratios in the carrots after cooking.

Metabolic studies: The mean lithium content of the daily portion of vegetables assigned to the volunteers during a metabolic study, was $106.6 \pm 25.3 \mu\text{mol Li}$. the greatest intake was calculated for the vegetable batches of one subject (NG). The intake assigned to each volunteer was based on the actual Li and Na content of the duplicate portions from each subject's batch of vegetables. Each volunteer had a standard amount of vegetable but the variability in calculated lithium content indicates the importance of testing each batch for their mineral content.

Table 4 sets out the recoveries of Li from 5 subjects who had received Li in both the cooked foods and the vegetables. The dominant route of excretion proved to be the urine 93% and the high recovery rates shows that there was no unusual binding of Li by the cooked vegetables or other dietary ingredients. This contrast with a residual Li excreted in faeces of about $1.7 \mu\text{mol}$ per day when the naturally derived Li from plants amounts to $4.7 \mu\text{mol/day}$ in young English adults (unpublished observations). Thus, about 36% of plant food lithium, presumably associated with residual plant cell walls, is normally excreted in the faeces. The results in Table 4 show, however, that it is legitimate to use the Li tagged salt for tracking the amount of cooking salt actually eaten in households because of the very high intestinal uptake and renal excretion of lithium.

TABLE 4
THE RECOVERY OF LITHIUM LABELLED COOKING SALT EXPRESSED AS A PERCENTAGE OF INTAKE

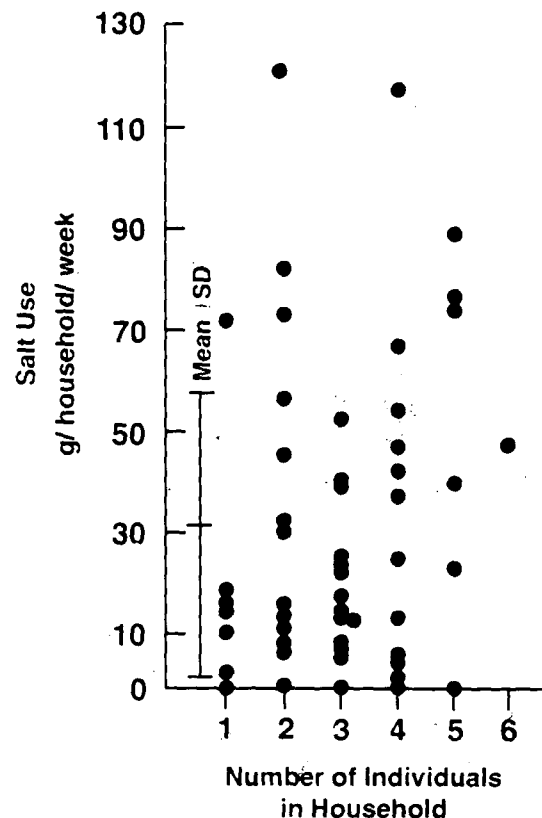
Subject	Urine	Sweat	Faeces
NG	98.9	1.0	0.6
RT	98.9	2.1	1.1
JP	98.7	2.9	0.9
JW	89.3	1.4	1.0
RG	95.1	1.0	2.0
Mean	96.2	1.68	1.12
SD	4.17	0.82	0.53

Lithium in urine: Baseline lithium excretion was measured during the first experimental period in which subjects were put on a metabolic diet. Baseline excretion in individuals ranged from 4.1 to $5.3 \mu\text{mol Li}$ with a coefficient of variation between individuals of 9.2%.

However, during the 6-day labelled cooking salt period, urinary lithium excretion was remarkably similar from subject to subject. Thus, total recoveries of lithium used as cooking salt were 100.5, 102.1, 102.5, 91.7 and 98% for the 5 subjects (mean $99\% \pm 4.4\%$ SD). Of the total Li intake $96.2 \pm 4.2\%$ of cooking salt was excreted through the kidneys. This reflected the constant amounts of labelled cooking salt used and shows how uniform the response of the volunteers was in terms of the route for Li excretion.

Epidemiological study: In Figure 2 the variation in cooking salt use in households of varying size is shown. The total amount of cooking salt used per household did not seem to increase in proportion to the number of members in the household. Thus, households with two occupants had a similar average cooking salt use to that of households with five inhabitants. Thus salt use per individual was less in those from larger families. The weekly cooking salt intake per household member was $12.3 \pm 14.1 \text{ g}$ (Mean \pm SD) but there was substantial scatter with a range from 0 to 72 g salt used. There was no relationship between table and cooking salt intake in either the men or women. Thus, there seemed to be no tendency for women to salt the food heavily during cooking and then to add extra salt to their own food.

FIGURE 2
The household use of labelled cooking salt



Weekly cooking salt intake in fifty three households

DISCUSSION

It is remarkable how little information there is on the gains and losses of salt during the domestic preparation of food. Only a small proportion of the salt added to water for cooking foods will in practice be eaten. During the metabolic study parallel cooking experiments were conducted with different batches of vegetables where the proportions of sodium uptake by the foods and of that remaining in the cooking water were determined. The results showed that $36 \pm 3\%$, $34.5 \pm 3\%$ and $20.8 \pm 1.5\%$ of the salt added during cooking was recovered in carrots, runner beans and potatoes respectively, the rest being discarded in the cooking water. These figures suggest that about a third of the salt added during the cooking of vegetables will be ingested by the household. The proportion distributed among the members of the household will, of course, depend on the amounts of food allocated to each person. Food wasted in saucepans or on plates will further reduce the contribution of this source to the total intake in each individual. Nevertheless, if the household purchase of cooking salt are expressed per head, then perhaps only 30% of the household salt use might be expected to be consumed.

The epidemiological data provided a direct check on these estimates because not only was total cooking salt use by the household measured, but individual intakes could be quantified from the lithium data. A value of 24% was obtained for the average intake per head of the «purchased» cooking salt, this value also being expressed on a per head basis.

The only other data in the literature on this point is that of Toth and Sugar from Hungary (1975) (20) who claimed that 41% of the salt purchased by households is actually ingested. This figure of course includes table salt where the assumption is that a very much higher proportion of the salt is actually consumed. If the weight loss of table salt by adults taking part in the epidemiological study is added to the weight loss of cooking salt, and when these are related to actual intakes, then perhaps 33% of salt purchased is actually eaten. This illustrates the importance of a proper assessment of cooking salt intakes. Attempts to rely simply on the total use of household salt supplies will clearly exaggerate markedly the true intake of individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks are due to the Ministry of Health in Mexico (Department of International Relations), the Scottish Office Agriculture and Fisheries Department and the British Council for their support.

REFERENCES

- Dahl L.K & Love R.A. NaCl intake as related to human hypertension. *Fedn. Proc.* 15:512, 1956.
- Dahl L.K. Sodium intake of the American male: implications on the etiology of essential hypertension. *Am J Clin Nutr.* 6:1-7, 1958.
- Dahl L.K. Possible role of chronic excess salt consumption in the pathogenesis of essential hypertension. *Am J Cardiol* 8:571-75, 1961.
- Dahl L.K. Salt and hypertension. *Am J Clin Nutr.* 25:231-44, 1972.
- Gleibermann L. Blood pressure and dietary salt in human populations. *Ecology Food Nutrition* 2:143-56, 1973.
- MacGregor G.A., Markandu N.D., Best F.E., Elder D.M., Cam J.M. & Sagnella G.A. Double blind randomised crossover trial of moderate sodium restriction in essential hypertension. *Lancet* i:351-54, 1982.
- Beckman S.L. & Hjermer I. The Oslo Study. Non-pharmacological intervention on mild hypertension. Abstract presented at the International Symposium on Diet and Primary Prevention of Hypertension. Kuopio 25-27 pp.9, 1984 June.
- Law M.R., Frost C.D. & Wald N.J. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? I. Analysis of observational data among populations. *Brit Med. J* 302: 811-14, 1991.
- Frost, C.D., Law, M.R. & Wald, N.J. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? II. Analysis of observational data within populations. *Brit. Med. J.* 302: 815-18, 1991.
- Ambard et Bejard. Causes de l'Hypertension Arterielle. *Arch Gen Med* 1:520-34, 1904.
- Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *Brit Med J* 297: 319-28, 1988.
- Escamilla-Cejudo J.A., López-Cervantes M., Escobedo De la Peña, J. & Bustamente Montes L.P. Prevalencia de hipertensión arterial y factores asociados en una delegación política de la Ciudad de México. *Arch Inst. Cardiol Mex* 62:267-75, 1992.
- Secretaría de Salud, Consejo Asesor en Epidemiología: México: Información Prioritaria en Salud, 1991.
- Ericsson Y. & Anderson R. Fluoride ingestion with fluoridated domestic salt under Swedish dietary conditions. *Caries Res.* 17:277-88, 1983.
- Coatney G.R., Mickelsen O., Burges R.W., Young M.D. & Pirkle C.I. Chloroquine or pyrimethamine in salt as a suppressive against sporozoite-induced vivax malaria (chesson strain). *Bull. Wld Hlth. Org.* 19:53-67, 1958.
- Law M.R., Frost C.D. & Wald N.J. By how much dietary salt reduction lower blood pressure? III. Analysis of data from trials of salt reduction. *Brit Med j* 302:819-23, 1991.
- Sánchez Castillo C.P., Seidell J. & James W.P.T. The potential use of lithium as a marker for the assessment of the sources of dietary salt: cooking studies and physiological experiments in men. *Clin Sci.* 72:81-6, 1987.
- Sánchez Castillo C.P., Branch W.J. & James W.P.T. A test of the validity of the lithium-marker technique for monitoring dietary sources of salt in man. *Clin Sci* 72:87-94, 1987.
- Sánchez Castillo C.P., Warrender S., Whitehead T. & James W.P.T. An assessment of the sources of dietary salt in a British population. *Clin Sci* 72:95-102, 1987.
- Toth K. Von & Sugar E. Über den Talichen, auf das Körpergewicht bezogenen Verbrauch von Speisesalz. *Dt. Zahnortl. Z.* 30:231-36, 1975.
- James W.P.T., Ralph A. & Sánchez Castillo C.P. The dominance of salt in manufactured food in the sodium intake of affluent societies. *Lancet* i:426-29, 1987.

Recibido: 20-03-1995

Aceptado: 20-07-1995

Pasado y presente en el diseño de fórmulas infantiles

Patricia Ana Ronayne de Ferrer *

Dpto. de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. Se reseña brevemente la historia de las formas alternativas de alimentación infantil desde los primeros alimentos preparados a fines del siglo pasado hasta el diseño de las actuales fórmulas para lactantes, enumerando los distintos tipos de fórmulas existentes (a base de leche de vaca, de proteína de soja, hipoalérgicas, fórmulas sin lactosa, etc.). Entre los aspectos nutricionales, se destacan las principales características en las formulaciones, con especial énfasis en las fracciones nitrogenada, grasa y mineral. Dentro de la fracción nitrogenada, debe tenerse en cuenta que el perfil de aminoácidos de las fórmulas a base de leche de vaca difiere según la relación caseína/proteínas del suero que posean (80:20 o bien 40:60 en las «adaptadas» o «maternizadas»). Por otra parte, últimamente se ha reconocido la importancia de ciertos componentes del nitrógeno no proteico, tales como la taurina, la carnitina y los nucleótidos, motivo por el cual se ha comenzado a agregarlos a las fórmulas. En la fracción grasa, se da gran importancia al equilibrio en el aporte de ácidos grasos esenciales, recomendándose una relación entre las series n-6 y n-3 no demasiado alejada de la presente en la leche humana, y el aporte de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ya preformados. En la fracción mineral es importante considerar la biodisponibilidad y las proporciones relativas entre los distintos oligoelementos, ya que ello incide en su utilización. Otros conceptos de importancia son la carga renal de solutos y la osmolaridad, por su influencia en el equilibrio metabólico del lactante.

SUMMARY. Past and present status in the design of infant formulas. This paper describes briefly the history of infant foods, from the alternate ways of feeding developed during the late 19th century to the present-day infant formulas, and enumerates the different available types (milk-based, soy-based, hypoallergenic, lactose-free, etc.). Among the nutritional aspects, the main characteristics of formulation are emphasized, especially within the nitrogen, fat and mineral fractions. Considering the nitrogen fraction, it must be taken into account that the amino acid profiles in milk-based formulas differ according to the casein/whey proteins ratio (either 80:20 or 40:60 in the so-called «adapted» or «humanized»). On the other hand, it has been recognized recently that some non-protein components of human milk, such as taurine, carnitine and nucleotides, are relevant to infant nutrition and therefore, they are being included in some formulas. Regarding fat, essential fatty acids supply is very important; present recommendations stress the importance of providing n-6 to n-3 series ratios close to that found in human milk and also a preformed supply of long-chain polyunsaturated fatty acids. Among minerals, bioavailability and relative proportions of trace elements are important issues in formulation. Other concepts of relevance are the renal solute load and the osmolarity because of their effect on neonate's metabolism.

INTRODUCCION

La lactancia natural ha sido la principal, si no única, forma de alimentar al neonato desde los inicios de la historia de la humanidad. Antiguamente, pocos bebés sobrevivían a menos que fueran alimentados al pecho. Actualmente, en muchos países en desarrollo, ésta puede ser aun de importancia vital

para el recién nacido. La leche materna constituye una fuente económica e importante de nutrientes esenciales en la etapa neonatal, que representa la época más crítica y vulnerable de la vida. Es por ello que se considera a la leche humana como la mejor fuente de nutrientes para el bebé (1,2,3,4).

Las formas alternativas de alimentación infantil casi no existieron hasta fines del siglo pasado, cuando aparecieron alimentos preparados a base de leche de vaca combinada con cereales y, en algunos casos, también azúcar. En 1856 se desarrolló el método de obtención de leche evaporada con agregado de azúcar (leche condensada), y en 1883, el mismo

* Dra. en Bioquímica. Profesora Adjunta de Bromatología. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

procedimiento se aplicó a leche evaporada, sin azúcar. Estos tratamientos tecnológicos eliminaron el problema del coágulo duro y difícil de digerir formado cuando la leche de vaca no se trataba térmicamente (5,6,7).

La historia de las actuales fórmulas infantiles comenzó en 1915 cuando Gerstenberger y col. (8) desarrollaron una fórmula artificial con una composición centesimal similar a la de la leche humana. En 1920 fue introducida comercialmente con el nombre SMA (Synthetic Milk Adapted: leche sintética adaptada) (9). El término fórmula para estos alimentos preparados surgió del hecho de que para calcular los requerimientos de nutrientes, los pediatras debían utilizar múltiples fórmulas matemáticas (6).

A pesar de los progresos en el conocimiento de la nutrición infantil y en el desarrollo de alimentos alternativos, en los lactantes no amamantados siguieron apareciendo muchos problemas nutricionales de importancia en salud pública. A través de diversos episodios de raquitismo, escorbuto, anemia megaloblástica, anemia microcítica, convulsiones, etc., se llegó al agregado, en las fórmulas, de vitamina D, vitamina C, folatos, hierro, formas termoestables de vitaminas B₆, y otros nutrientes (5). Por otra parte, a medida que se avanzó en el conocimiento sobre la composición de la leche humana, se trató de elaborar productos que se le asemejaran cada vez más, lo que llevó a formulaciones con modificaciones en la relación caseína/proteínas del suero (CAS/PS) de 80:20 a 40:60, cambios en las grasas utilizadas y adición de sustancias ausentes o presentes en muy baja cantidad en leche de vaca, tales como taurina, carnitina, y en los últimos años, nucleótidos y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Las implicancias de estos cambios en la formulación se discutirán más adelante.

Tipos de fórmulas

Existen diversos tipos de fórmulas para lactantes. Aquellas en las que la base es leche de vaca se elaboran con sólidos no grasos de leche y una mezcla de diversas grasas (generalmente aceites vegetales), hidratos de carbono (habitualmente lactosa), vitaminas, minerales, y otros componentes ya mencionados. Las fórmulas «adaptadas» o «maternizadas» con una relación CAS/PS 40:60 llevan además el agregado de suero de leche desmineralizado (10). Este puede obtenerse por distintos métodos, tales como intercambio iónico, electrodiálisis o ultrafiltración. Este último posee un contenido de proteína verdadera más elevado ya que gran parte del nitrógeno no proteico se pierde durante el proceso (11).

Dado que algunos lactantes presentan intolerancia a la leche de vaca, existen otras alternativas. La más popular es la de las fórmulas que utilizan proteína de soja aislada, suplementada con metionina, y en las que la lactosa se reemplaza por otros carbohidratos. Puesto que no contienen leche en su composición, eliminan las principales causas de la intolerancia a la leche de vaca, es decir, lactosa y proteínas lácteas.

Generalmente se utilizan en casos de alergia a la proteína láctea bovina mediada por IgE, intolerancia a la lactosa y galactosa y en gastroenteritis severas (10,12). También pueden ser indicadas a niños con galactosemia, enfermedad hereditaria debida a la deficiencia de galactosa-1-fosfato uridil transferasa, enzima que transforma a la galactosa en glucosa.

Si bien la incidencia de alergia a la proteína de soja es baja, estas fórmulas no pueden utilizarse en esa situación; en ese caso, suelen reemplazarse por hidrolizados proteicos (de caseína o proteínas del suero); estas fórmulas generalmente se designa como «hipoalérgicas». Esto significa que presentan menor probabilidad de provocar reacciones alérgicas pero que no están totalmente exentas de este riesgo. Antes de ser utilizadas, deben someterse a rigurosos tests, tanto clínicos como preclínicos (13).

Además de las ya mencionadas, existen otras fórmulas sin lactosa (con caseinato como fuente proteica). En las fórmulas sin lactosa, los carbohidratos más frecuentemente utilizados son las maltodextrinas como único componente, o bien en mezclas con sacarosa o glucosa (14, 15).

Por otra parte, existen fórmulas especiales para prematuros, las que habitualmente presentan un mayor contenido de proteínas (relación CAS/PS 40:60) y de minerales (excepto hierro) y también una mayor densidad energética (11), con agregado de parte de las grasas en forma de triglicéridos de cadena media.

Un caso particular es el de formulaciones especialmente diseñadas para individuos con errores congénitos de metabolismo (16).

En la Tabla 1 se presentan los rangos de composición centesimal en los diferentes tipos de fórmulas disponibles en el mercado.

Aspectos Nutricionales

La mayor parte de las fórmulas lácteas se elaboran a base de leche de vaca, por lo tanto es de utilidad comparar su composición con la de la leche humana. En la Figura 1 se observan las principales diferencias cuantitativas entre ambas. La leche bovina presenta una mayor concentración de proteínas y minerales, mientras que la leche humana contiene más lactosa. El tenor graso es similar en ambas. Debe destacarse que existen también importantes diferencias cualitativas entre ambas leches; las principales se mencionarán a continuación.

TABLA 1
RANGOS DE COMPOSICION CENTESIMAL DE FORMULAS INFANTILES

Tipo de Fórmula		Na	Energía (kcal/dl)	Proteína (g/dl)	Grasa (g/dl)	Hid. de C (g/dl)	Minerales (g/dl)
A base de leche de vaca	A-PT ^b	5	70-81	2,0-2,4	3,4-4,4	7,7-9,1	0,29-0,50
	A-T ^b	5	67-72	1,5-1,8	3,4-4,0	7,2-7,6	0,20-0,32
	Na ^d	7	67-75	1,5-2,7	2,8-3,8	7,4-8,2	0,25-0,63
A base de soja ^e		3	66-68	1,8-2,0	3,5-3,7	6,6-6,9	0,33-0,45
Otras	S/L ^f	2	67-73	1,9-2,4	3,3-3,6	7,4-7,7	0,36-0,90
	H-A ^g	2	65-67	1,6-2,2	3,4	6,9-7,4	0,24-0,54

a= Número de fórmulas de cada tipo

b= Fórmulas «adaptadas» (CAS:PS 40:60), para prematuros; el 100% tienen adición de taurina y el 40% de ácidos grasos poliinsaturados.

c= Fórmulas «adaptadas» (CAS:PS 40:60), para nacidos a término; el 100% tienen adición de taurina, el 20% de ácidos grasos poliinsaturados y el 20% de nucleótidos.

d= Fórmulas no «adaptadas» (CAS:PS 80:20); el 43% tienen adición de taurina.

e= El 100% tienen adición de taurina y carnitina.

f= Fórmulas sin lactosa; el 50% tienen adición de carnitina y taurina.

g= Fórmulas hipoalérgicas; el 50% tienen adición de carnitina y taurina.

FIGURA 1
Composición centesimal de las leches humana y bovina

	Leche humana (g/dl)	Leche bovina (g/dl)
Proteína	0,90	3,30
Grasa	3,30	3,50
Lactosa	7,00	4,80
Minerales	0,20	0,80
Sólidos totales	11,40	12,40

Fración nitrogenada: La clasificación de las proteínas lácteas se llevó a cabo en un principio en la leche bovina, distinguiéndose dos grupos principales: 1) la caseína, que precipita a pH 4, 6 o por acción enzimática, y 2) las proteínas del suero, que son todas aquellas que permanecen en solución en el suero lácteo. En la leche bovina, la caseína constituye alrededor de un 80% de las proteínas totales, mientras que en la leche humana predominan las proteínas del suero (60 a 70% del total de proteínas) (17,18). Estas diferencias entre las proteínas de la leche de vaca y de la leche humana se reflejan en el perfil proteico y, por ende, también en el perfil de aminoácidos de las fórmulas lácteas. Así, las que presentan un predominio de proteínas del suero tienen exceso de treonina, mientras que en aquellas con predominio de caseína hay excesiva cantidad de aminoácidos aromáticos. En Argentina la mayoría de las fórmulas infantiles están elaboradas a base de leche de vaca. Predominan las leches «adaptadas» o «maternizadas», es decir, con una relación CAS/PS 40:60 (19). En este punto sería importante señalar que si bien por

hábito el término «leche maternizada» es ampliamente usado, el Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna, aprobado por la Organización Mundial de la Salud en 1981, estipula que en el etiquetado no deben utilizarse términos como «humanizado», «maternalizado» o términos análogos.

Recientemente se ha propuesto el uso de la alfa-lactalbúmina bovina en la elaboración de fórmulas para lactantes, en un intento de lograr una mayor semejanza con dicho perfil (20). Ello se debe particularmente a su aporte de cistina y triptofano, dado que las fórmulas a base de leche bovina presentan a estos aminoácidos como limitantes (21).

Debe tenerse en cuenta, además, que todo fórmula es un producto industrializado y, como tal, sujeto a posible deterioros, ya sea durante su elaboración y/o almacenamiento. A este respecto es importante considerar la disponibilidad de aminoácidos, especialmente la lisina, la metionina y el triptofano (22, 23). En un estudio sobre disponibilidad de lisina en fórmulas infantiles deshidratadas, se observó una disminución entre 9 y 51% con respecto a la leche fluida pasteurizada (22).

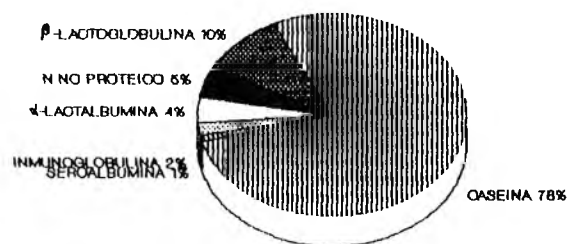
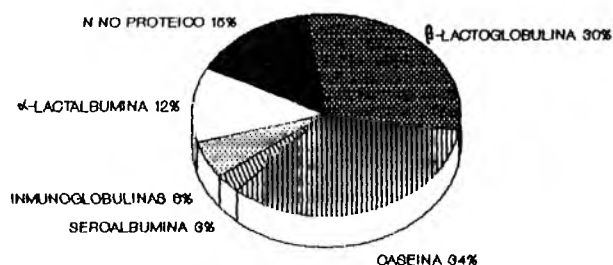
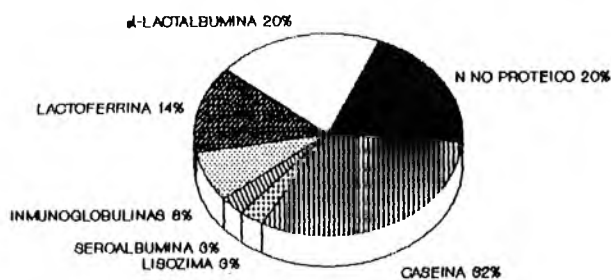
Diversos estudios han demostrado una sorprendente resistencia a las infecciones intestinales en bebés amamantados (24). Esta protección se debe a varios factores, entre ellos las inmunoglobulinas con actividad de anticuerpo contra diversos gérmenes patógenos (25, 26, 27), que confieren al neonato inmunidad pasiva. Dado que las fórmulas carecen de estas ventajas, se planteó la alternativa de diseñarlas con el agregado de anticuerpos obtenidos de leche de vacas hiperinmunizadas contra microorganismos específicos. Sin embargo, en un estudio de campo controlado, no se encontraron diferencias en

cuanto a incidencia de diarreas comparando con la misma fórmula sin agregado de anticuerpos (28). Por el momento, estos aspectos se encuentran en etapa experimental.

Por otra parte, es importante destacar que un sustituto de la leche materna, aunque se llame «leche maternizada» sigue presentando diferencias importantes con la leche humana, tanto en el perfil proteico (ya mencionado), como en la composición del nitrógeno no proteico (Fig. 2). En esta fracción, se ha reconocido en los últimos años la importancia de algunos de sus componentes, tales como la taurina, la carnitina y los nucleótidos.

FIGURA 2

Distribución relativa de nitrógeno proteico y no proteico

LECHE DE VACA**FORMULA LACTEA****LECHE HUMANA**

La taurina, además de sus funciones en la conjugación de ácidos biliares, interviene en el sistema nervioso central (29). Su concentración es elevada en tejidos excitables y en desarrollo, especialmente durante períodos de rápida proliferación celular. En el cerebro adulto su máxima concentración se encuentra en retina y bulbo olfatorio. Actuaría como un modulador de crecimiento, estabilizando membrana, ya sea inhibiendo sustancias tóxicas, o bien por efecto antioxidante, y/o actuando como osmorregulador (30,31). Actualmente se agrega taurina a la mayoría de las fórmulas infantiles.

La carnitina es esencial para el transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias para su beta-oxidación. Se encuentra en la leche de todas las especies. En el neonato la fuente principal es la leche materna o las fórmulas a base de leche de vaca, ya que su capacidad de biosíntesis endógena puede ser limitada. Dado que los depósitos no son abundantes, el aporte dietético es importante, especialmente en los prematuros. Las fórmulas a base de soja se suplementan con carnitina, ya que se observaron niveles plasmáticos más bajos en bebés alimentados con este tipo de fórmulas sin suplementar (32).

Los nucleótidos han cobrado gran importancia en los últimos tiempos ya que se les atribuyen diversas funciones: estimularían la inmunidad de los neonatos (33); actuarían como promotores de las Bifidobacterias a nivel de la flora intestinal (34); podrían facilitar la absorción del hierro (35); intervendrían en el metabolismo de los lípidos (36); y también mejorarían la maduración y proliferación gastrointestinal (37). En Argentina por el momento sólo una fórmula tiene agregado de nucleótidos (19).

Se ha mencionado previamente que el perfil de aminoácidos presenta ciertas características, según se trate de fórmulas con predominio de caseína o de proteínas del suero. Sin embargo, no se le ha dado la misma importancia al contenido y composición del nitrógeno no proteico, que pueden diferir en gran medida según el tipo de fórmula y el método de elaboración (11, 38). Estas diferencias incidirían en el contenido de «proteína verdadera» y podrían ser importantes en la evaluación clínica al comparar distintas fórmulas (38).

Fracción glucídica: La lactosa -disacárido compuesto por glucosa y galactosa- es el carbohidrato predominante de la leche, tanto humana como bovina y también lo es en la mayoría de las fórmulas para lactantes. Su función principal es la de aportar energía, junto con la grasa. El hecho de que en la naturaleza la lactosa sólo aparezca en la leche, lleva a pensar que este azúcar debe tener una ventaja en la alimentación del neonato (39). Entre sus efectos beneficiosos se puede mencionar que la lactosa promueve la absorción del calcio y también que, junto con otros factores, favorece la implantación de una flora acidófila.

La leche humana también contiene cantidades ínfimas de glucosa y cantidades pequeñas pero significativas de oligosacáridos y aminoazúcares. Los principales aminoazúcares son la glucosamina, el ácido siálico y la

galactosamina. En los años 50 se descubrió que la leche humana era 100 veces más activa que la leche de vaca en la promoción del desarrollo de las Bifidobacterias y ello se asoció a la presencia de aminoazúcares que forman parte de oligosacáridos y glicoproteínas. Dado que las fórmulas lácteas prácticamente carecen de ellos, eso afectaría la cantidad de Bifidobacterias en lactantes amamantados vs. alimentados con fórmulas (32).

Por otra parte, se ha descubierto la presencia de oligosacáridos de estructura similar a receptores de epitelio retrofaringeo, lo que lleva a suponer que se unirían a potenciales patógenos por su similitud con receptores normalmente presentes en células epiteliales (22). También se ha atribuido a ciertos oligosacáridos la capacidad de bloquear la acción de enterotoxinas de origen microbiano (40).

Como se mencionó previamente, existen casos de intolerancia a la lactosa que requieren un alimento libre de este azúcar. Todas las fórmulas a base de proteína de soja están exentas de lactosa, así como otras fórmulas diseñadas con ese objetivo. En todos los casos se recurre al uso de maltodextrinas, ya que ello permite mantener una baja osmolaridad en el producto. Además, son bien digeridas, ya que la glucoamilasa de la mucosa intestinal mantiene su actividad aún cuando haya daños en la misma y deficiencias de lactasa y sacarasa. Habitualmente, la maltodextrina es el único carbohidrato presente, o bien es el mayoritario, en mezclas con sacarosa o glucosa (14, 15). En la Tabla 2 se observan los porcentajes de los distintos carbohidratos que intervienen en la composición de las fórmulas infantiles.

TABLA 2
PORCENTAJE DE HIDRATOS DE CARBONO EN
FORMULAS INFANTILES

Tipo de Fórmula	N ^a	Lactosa	Malto-dextrina	Sacarosa	Glucosa	
A base de leche de vaca	A-PT ^b	5	40-90	10-60	—	—
	A-T ^c	5	72-100	0-28	—	—
	NA ^d	7	37-100	0-26	0-37	—
A base de soja	3	—	67-100	0-33	—	
Otras	S/L ^e	2	—	80-100	—	0-20
	H-A ^f	2	0-70	30-100	—	—

a= Número de fórmulas de cada tipo

b= Fórmulas «adaptadas» (CAS:PS 40:60), para prematuros.

c= Fórmulas «adaptadas» (CAS:PS 40:60), para nacidos a término.

d= Fórmulas no «adaptadas» (CAS:PS 80:20).

e= Fórmulas sin lactosa.

f= Fórmulas hipoalérgicas.

Fracción grasa: En la leche humana los ácidos grasos saturados constituyen un 42 a 47% mientras que los insaturados representan un 53 a 58% de los ácidos grasos totales (rel. saturados a insaturados 45/55). Por el contrario, en la leche de vaca predominan los saturados (rel. alrededor de 65/35). Los ácidos grasos predominantes en la leche humana son el oleico

(18:1 n-9, 32,8%), el palmítico (16:0, 22,6%) y el linoleico (18:2 n-6, 13,6%), siendo este último el más abundante de los esenciales (18). En la leche bovina predominan el oleico (26,2%) y el palmítico (25,4%) y existe una cantidad apreciable de ácidos grasos de cadena corta, particularmente el butírico (4:0) (41). El perfil de ácidos grasos es importante para su absorción. Esta disminuye a medida que se incrementa el largo de cadena, y varía con el grado de saturación, ya que los insaturados se absorben mejor que los saturados (42).

Además del perfil global de ácidos grasos, también es importante la relación entre las series n-6 y n-3, (denominadas así por la ubicación de los dobles enlaces), series esenciales para el ser humano. A partir de estos ácidos grasos esenciales, se sintetizan derivados de gran importancia biológica. Dado que las series n-6 y n-3 compiten por las mismas enzimas, deben encontrarse en equilibrio para evitar déficit relativos de la otra serie. Se recomienda una relación entre 5:1 y 15:1 o hasta 30:1 (42, 43, 44). Tampoco sería conveniente una relación linoleico/alfa-linolénico inferior a 4:1, ya que daría un perfil de ácidos grasos muy diferente del de bebés amamantados (45). En general, el criterio es el de utilizar un rango similar al de la leche humana (que está alrededor de 10) y evitar valores extremos (42). Algunas de las fórmulas disponibles en el mercado exceden los valores recomendados, incluso por encima de 30:1 (15, 19, 46).

Por otra parte, debe recordarse que las grasas no sólo se utilizan como sustrato energético sino también como parte estructural de determinados tejidos (47). Es de destacar en la leche humana la presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (especialmente los de 20 a 22 átomos de carbono) por su importancia para el crecimiento y maduración del sistema nervioso del neonato, los que están ausentes en la leche de vaca (48). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, especialmente el ácido araquidónico (AA) (20:4, n-6), y el ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6, n-3), son los predominantes en cerebro y retina (47, 49). Si bien estos ácidos grasos pueden obtenerse a partir de sus precursores, pueden resultar «condicionalmente» esenciales en ciertas situaciones metabólicas, particularmente en neonatos prematuros (50). Es por ello que resulta más conveniente el aporte de dichos ácidos grasos preformados. Ambos son importantes para procesos de aprendizaje y función visual (51). Sin embargo, también debe identificarse el balance óptimo ya que un suplemento de aceite marino (rico en DHA) puede interferir con la síntesis de AA (52). En Argentina, sólo dos fórmulas tienen agregado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (19).

La posición relativa de los ácidos grasos en los triglicéridos puede tener importancia nutricional (53). En la leche humana, el ácido palmítico ocupa principalmente la posición 2 del triglicérido. Esto favorece la digestibilidad de las grasas y la absorción del calcio, ya que por acción de lipasas se forma el 2-monoglicérido que se absorbe como tal. De otro modo, se liberaría el ácido palmítico, que daría jabones de calcio insolubles, produciendo una disminución en la absorción de

ácidos grasos y calcio. Algunas de las fórmulas disponibles en el mercado, poseen una proporción importante de ácido palmítico en posición 2.

Fración mineral: El tenor total de minerales en la leche humana es bajo, lo que es de gran importancia fisiológica dado que una menor carga renal favorece al riñón inmaduro del lactante. En particular, es de destacar que las concentraciones de sodio, potasio y cloruro en la leche humana es menor que en leches de otras especies. La suma de estos tres iones es un tercio de la cantidad presente en leche de vaca. La baja concentración iónica de la leche humana disminuiría el requerimiento de excreción renal de iones y agua, lo que daría al bebé mayor libertad en el uso del agua para el control de la temperatura a través del sudor y de la pérdida insensible de agua (54).

La relación calcio/fósforo ideal es la presente en la leche humana, que es de 2 a 1 (55,56) pero técnicamente es difícil modificarla en fórmulas a base de leche de vaca, porque viene dada por su proporción en caseína, y el agregado de sales acarrea problemas de solubilidad, aumento de la osmolaridad y de la carga renal de solutos (57).

Un aspecto fundamental de los minerales presentes en la leche humana, en particular el magnesio, el hierro, el cobre y el zinc, es su alta biodisponibilidad, cuando se la compara con la de sustitutos tales como la leche de vaca o fórmulas comerciales. Se ha demostrado que la distribución de estos elementos difiere en la leche de vaca y humana (58,59). Así, la caseína bovina tiene una elevada proporción de los mismos (25% de Mg, 24% de Fe, 44% de Cu y 84% de Zn) al contrario de lo observado en la caseína humana (6% de Mg, 9% de Fe, 7% de Cu y 8% de Zn). En la leche humana, en cambio, estos minerales se encuentran ligados a proteínas del suero, a citrato o a la membrana proteica del glóbulo de grasa. Se presume que estas diferencias podrían incidir en la absorción de estos nutrientes y explicar su mayor disponibilidad en la leche humana. Un caso de particular importancia es la presencia de fitatos en fórmulas a base de soja, que es especialmente negativa en el caso del zinc. También disminuye la absorción de calcio, fósforo y magnesio (60).

Los oligoelementos que comparten vías comunes de absorción compiten entre sí y el desequilibrio en sus proporciones en las fórmulas puede dificultar su utilización (por ej., hierro/zinc, zinc/cobre, hierro/magnesio) (61).

Otro punto importante es el relativo al hierro. El uso de fórmulas fortificadas con hierro ha contribuido a la prevención de la anemia ferropénica. Tanto las fórmulas a base de leche de vaca como de proteína de soja resultan efectivas a este respecto (62).

Ello puede atribuirse en gran parte al hecho de que el ácido ascórbico también se agrega a las fórmulas infantiles, ya que su adición mejora notablemente la absorción del hierro. Se ha demostrado que el máximo efecto se logra con una relación

molar de 1:4 entre el hierro y el ácido ascórbico (63). Los niveles habituales de fortificación con hierro se encuentran entre 7 y 12 mg/l, mientras que la relación molar entre el hierro y la vitamina C fluctúa entre 1:1,4 a 1:3,6.

Por otra parte, también se ha planteado la importancia de no agregar hierro en exceso por diversos motivos:

- a. a principios de los años 70, se observaron casos de anemia hemolítica en recién nacidos de bajo peso alimentados con ciertas fórmulas; según se supo después, esta situación resultó de la interacción de tres factores: vitamina E, hierro y ácidos grasos poliinsaturados. La dieta de estos prematuros contenía altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados, lo que llevaba a una elevada proporción de los mismos en la membrana de los glóbulos rojos. Esta era más susceptible al daño oxidativo, lo que normalmente no hubiese tenido consecuencias debido a la acción antioxidante de la vitamina E. Sin embargo, el prematuro tiende a niveles bajos de vitamina E debidos a una menor absorción; frente a esta deficiencia relativa de vitamina E, el hierro iónico altera la membrana, causando la hemólisis. Actualmente, las fórmulas infantiles poseen niveles equilibrados de vitamina E y ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, se tiende a utilizar fórmulas no fortificadas con hierro durante las primeras 2 a 6 semanas de vida en neonatos de muy bajo peso al nacer (62, 64).
- b. grandes dosis dificultan la absorción de zinc y cobre. Sin embargo, no es probable que esto constituya un problema en las fórmulas actuales, ya que también se fortifican con estos minerales. Sólo las fórmulas a base de soja podían presentar un problema potencial, debido a su menor biodisponibilidad de zinc, como se mencionó previamente.
- c. interferiría con la «inmunidad nutricional». Este concepto se refiere a la acción bacteriostática de las proteínas ligadoras de hierro (lactoferrina y transferrina) que compiten con los microorganismos del tracto gastrointestinal por el hierro. Esta acción podría verse comprometida con el agregado de hierro en cantidades elevadas.

En la Tabla 3 se observan los niveles de sodio, hierro y las relaciones calcio/fósforo y hierro/vitamina C en los distintos tipos de fórmulas.

TABLA 3
MINERALES EN FORMULAS INFANTILES

Tipo de Fórmula		N ^a	Sodio (mg/dl)	Hierro (mg/dl)	Ca/P	Fe: Vit. C
A base de leche de vaca	A-PT ^b	5	26-42	0,07-1,2 ^g	1,5-2,0	1: 2,8-1:3,3
	A-T ^c	5	15-20	0,7 -1,2	1,5-2,0	1: 1,5-1:3,6
	NA ^d	7	23-45	0,8 -1,2	1,3-1,4	1: 1,4-1:2
A base de soja		3	20-32	1,2	1,3-1,4	1: 1,4-1:2,1
Otras	S/L ^e	2	23-42	0,8	1,5-2,1	1: 2,1-1:2,2
	H-A ^f	2	16-54	0,8	1,5-1,8	1: 2,6-1:2,7

a= Número de fórmulas de cada tipo.

b= Fórmulas «adaptadas» (CAS:PS 40:60), para prematuros.

c= Fórmulas «adaptadas» (CAS:PS 40:60), para nacidos a término.

d= Fórmulas no «adaptadas» (CAS:PS 80:20).

e= Fórmulas sin lactosa.

f= Fórmulas hipoalergénicas.

g= Las fórmulas sin fortificar (3) tienen entre 0,07 y 0,3 mg/dl y las fortificadas (2) 1,0 y 1,2 mg/dl.

Fracción vitamínica: Como se mencionó en la introducción, cuando se comenzaron a utilizar fórmulas industrializadas para la alimentación de lactantes, surgieron diversos problemas nutricionales, debidos a deficiencias de nutrientes o desequilibrios entre los mismos. Muchos de estos problemas se relacionaban con deficiencias vitamínicas, lo que llevó sucesivamente al agregado de vitamina D, vitamina C, folatos, etc. La adición de ácido ascórbico era importante no solamente para la prevención del escorbuto, sino también para la de la anemia megaloblástica, ya que se requería para la activación del ácido fólico (5). Por otra parte, la adición de ascorbato estabiliza a los folatos frente al tratamiento térmico (65). Un efecto adicional, como se vio en el apartado anterior, es el de mejorar la absorción del hierro.

Un caso de particular interés se observó en 1952, cuando una fórmula que se comercializaba tanto en polvo como fluida, ocasionó hiperirritabilidad y convulsiones en lactantes alimentados sólo con la forma fluida, la que había sido sometida a un proceso de esterilización (5,65). Este efecto se debía a que en la leche las formas predominantes de la vitamina B₆ son el piridoxal y, en segundo término, la piridoxamina, las que en presencia de grupos sulfhidrilos de la proteínas, reaccionaban para dar bis-4-piridoxil disulfuro, un compuesto de baja actividad vitamínica. El problema se solucionó a partir de 1953 con la adición de piridoxina, que es termoestable (65).

Ya se ha hecho referencia a la importancia de que exista un equilibrio entre los niveles de vitamina E y de ácidos grasos poliinsaturados; las recomendaciones actuales indican un mínimo de 0,7 UI de vitamina E/g de ácido linoleico.

En términos generales, puede decirse que en la actualidad las fórmulas incorporan las vitaminas, tanto hidro como liposolubles, en las cantidades adecuadas como para cubrir los requerimientos de los lactantes.

Carga renal de solutos y osmolaridad

Otros conceptos de importancia son la carga renal de solutos y la osmolaridad, que no deben confundirse entre sí. Se denomina carga renal de solutos a los productos de desecho solubles que deben eliminarse a través del riñón; dado que este proceso requiere agua, la carga renal de solutos ejerce un efecto muy importante sobre el balance de agua. El término carga potencial renal de solutos (CPRS) se refiere a los solutos de origen dietario que se excretarían por orina si nada se destinara a síntesis tisular ni se eliminara por vías no renales. La CPRS consiste de sustancias nitrogenadas (principalmente urea, ácido úrico, creatina y creatinina), sodio, cloruro, potasio y fósforo. Estas sustancias constituyen más del 90% de la carga renal de solutos total. Ziegler y Fomon (66) han propuesto una forma de calcular la CPRS, como sigue:

$$\text{CPRS (mosmol)} = \text{N}/28 + \text{Na} + \text{Cl} + \text{K} + \text{P}$$

donde N es el nitrógeno dietario expresado en miligramos (N/28 son los milimoles de urea) y Na, Cl, K y P se expresan en milimoles. El valor N/28 es una simplificación, en la que se supone que todo el nitrógeno dietario se convierte en urea.

En general, la sobrecarga de solutos no es un problema en niños con una ingesta abundante de líquidos, pero debe tenerse en cuenta ante situaciones que implican restricción en la

ingesta de agua, exceso de ingesta de solutos, ambas, o limitación en la capacidad de concentración renal (67).

Por otra parte, la osmolaridad de una fórmula depende de la cantidad de sustancias osmóticamente activas presentes. Los carbohidratos, especialmente los mono y disacáridos, son los más importantes junto con los electrolitos sodio, cloro y potasio (5). La fracción proteica sólo es importante cuando está hidrolizada y las grasas, cuando aportan ácidos grasos de cadena corta o media (67).

La importancia de la osmolaridad de un alimento radica en que al ser introducido en el tubo digestivo, éste responde con secreción de agua y electrolitos hasta lograr un equilibrio entre la osmolaridad intraluminal e intersticial. Cuando la osmolaridad del alimento es elevada, puede tener lugar un flujo masivo de líquido hacia la luz intestinal con producción de diarreas, y eventualmente, de daños en la pared intestinal (5,67).

CONCLUSIONES

No cabe duda de que la lactancia materna es la alimentación ideal del neonato, ya que cubre los requerimientos de nutrientes durante los primeros 4 a 6 meses de vida, aporta factores de defensa contra las infecciones y favorece el desarrollo de Bifidobacterias, además de favorecer el vínculo emocional entre madre e hijo. Otro punto relevante, particularmente en los países latinoamericanos, es su costo, ya que la alimentación al pecho es la más económica durante los primeros meses de vida. Por estos motivos, la promoción y apoyo a la lactancia materna deben ser prioritarios en los programas de salud materno-infantil.

Sin embargo, en ciertas situaciones es necesario complementar o reemplazar a la leche materna. En esos casos, los sucedáneos utilizados deben asegurar una nutrición adecuada, compatible con la madurez gastrointestinal del lactante y deben ser preparados en condiciones higiénicas, a fin de evitar el riesgo de infecciones gastrointestinales. Las fórmulas disponibles en el mercado están diseñadas para aportar los nutrientes necesarios, con una tolerancia gastrointestinal adecuada, si bien su costo limita su uso en poblaciones de bajos recursos. En bebés recién nacidos que no pueden ser amamantados, habitualmente se utilizan las llamadas "fórmulas de inicio", a base de leche de vaca con una relación CAS/PS 40:60. tanto para los prematuros como para los de término. A partir de los 4 a 6 meses se suele pasar a "fórmulas de continuación o seguimiento", con una relación CAS/PS 80:20, junto con la introducción de alimentos semisólidos. En los casos de intolerancia a la leche de vaca, se recurre a las fórmulas a base proteína de soja o bien a las hipoalérgicas. El diseño de estos alimentos debe tomar como referencia a la leche humana, si bien por el momento la fórmula infantil "perfecta" se presenta como un ideal inalcanzable.

REFERENCIAS

1. Hambraeus L. Proprietary milk versus human breast milk in infant feeding. A critical appraisal from the nutritional point of view. *Pediatr Clin North Am* 24:17-36, 1977.
2. Ogra PL & Greene LH. Human milk and breast feeding: an update on the state of the art. *Pediatr Res* 16:266-271, 1982.
3. O'Donnel AM. Alimentación del niño en América Latina. *ALAN* 38:685-704, 1988.
4. Informe de la Reunión, Taller celebrado en la isla de Margarita, 15-20 de marzo de 1994. La alimentación del niño menor de 6 años en América Latina. Bases para el desarrollo de guías de Alimentación. *ALAN* 44:176-198, 1994.
5. Anderson SA, Chinn HI & Fisher KD. History and current status of infant formulas. *Am J Clin Nutr* 35: 381-397, 1982.
6. Barnes LA. History of infant feeding practices. *Am J Clin Nutr* 46:168-70, 1987.
7. Filer Jr LJ. Safe foods for infants- The regulation of milk, infant formulas and other infant foods. *J Nutr* 123:285-288, 1993.
8. Gerstenberger HJ, Haskins HD, McGregor HH & Ruh HO. Studies in the adaptation of an artificial food to human milk. *Am J Dis Child* 10: 249-265, 1915.
9. Gerstenberger HJ & Ruh HO. Studies in the adaptation of an artificial food to human milk. II. A report of three years' clinical experience with the feeding of S.M.A. (synthetic milk adapted). *Am J Dis Child* 17:1-37, 1919.
10. Fomon SJ. Reflections on infant feeding in the 1970s and 1980s. *Am J Clin Nutr* 46:171-182, 1987.
11. Raiha NCR. Protein quantity and whey-casein ratio in infant formulas. En: *Protein and Non-Protein Nitrogen in Human Milk*. Atkinson SA, Lonnerdal B, Eds. Boca Raton, Fla, CRC Press Inc., p. 138-144. 1989.
12. Businco L, Bruno G, Giampietro PG & Cantani A. Allergenicity and nutritional adequacy of soy protein formulas. *J Pediatr* 121:S21-S8, 1992.
13. Kleinman RE. Cow milk allergy in infancy and hypoallergenic formulas. *J Pediatr* 121:S116-S21, 1992.
14. Roviroso A. Los carbohidratos en la alimentación infantil. *Boletín CESNI* 6:26-34, 1993.
15. Ronayne de Ferrer, P.A. Fórmulas infantiles sin lactosa. *Rev Chil Nutr* 22:33 (Resumen N° 27), 1994.
16. Nayma R, Thompson ME, Scriver CR & Clow CL. Observations on the composition of milk-substitute products for treatment of inborn errors of amino acid metabolism. Comparisons with human milk. A proposal to rationalize nutrient content of treatment products. *Am J Clin Nutr* 32:1279-1289, 1979.
17. Kunz C & Lonnerdal B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* 81:107-112, 1992.
18. Renayne de Ferrer PA. Leche humana: I. Composición nutricional. *Arch Arg Pediatr* 91:158-164; 1993.
19. Ronayne de Ferrer, PA. Fórmulas infantiles disponibles en Argentina. *ALAN* 44:85-S, (Resumen N° 6), 1994.
20. Heine WE, Klein PD & Reeds PJ. The importance of α -lactalbumin in infant nutrition. *J Nutr* 121:277-283, 1991.
21. Sarwar G, Botting HG & Peace RW. Amino acid rating method for evaluating protein adequacy of infant formulas. *J AOAC* 72:622-626, 1989.
22. Sambucetti ME & Troilo J. Aspectos nutricionales en la reglamentación de los alimentos para lactantes. *La Alimentación Latinoamericana* 129:61-644, 1981.
23. Hanning RM, Paes B. & Atkinson SA. Protein metabolism and growth of term infants in response to a reduced-protein, 40:60 whey: casein formula with added tryptophan. *Am J Clin Nutr*

- 56:1004-1011,1992.
24. Chandra RK. Prospective studies of the effect of breast feeding on incidence of infection and allergy. *Acta Paediatr Scand* 68:691-694,1979.
 25. Susuki S, A Lucas, Lucas PJ & Coombs RRA. Immunoglobulin concentrations and bacterial antibody titres in breast milk from mothers of "preterm" and "term" infants. *Acta Paediatr Scand* 72:671-677, 1983.
 26. Garza C. RJ Schanler, Butte NF & Motil KJ. Special properties of human milk. *Clin Perinatol* 14:11-32, 1987.
 27. Bozzola CM, López NE & Ceriani Cernadas JM. Factores inmunológicos de la leche humana. *Arch Arg Pediatr* 86:224-239, 1988.
 28. Brunser O, Espinoza J., G. Figueroa, M. Araya, Spencer E., Hilpert H, Link-Amaster H. & Brussow H. Field trial of an infant formula containing anti-rotavirus and anti-Escherichia coli milk antibodies from hyperimmunized cows. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 15:63-72, 1992.
 29. Harzer G, Franzke V. & Bindels JG. Human milk nonprotein nitrogen components: changing patterns of free amino acids and urea in the course of early lactation. *Am J Clin Nutr* 40:303-309, 1984.
 30. Gauld GE, Wright CE & Issacs CE. Significance of growth modulators in human milk. *Pediatrics* 75:142-145, 1985.
 31. Gauld GE. Taurine in pediatric nutrition: review and update. *Pediatrics* 83:433-442, 1989.
 32. Atkinson SA, Schnurr CM, Donovan SM. & Lonnerdal B. The nonprotein nitrogen components in human milk: biochemistry and potential functional role. En: Protein and Non-Protein Nitrogen in Human Milk. Atkinson S.A, Lonnerdal B, Eds. Boca Raton, Fla, CRC Press Inc., p. 117-133. 1989.
 33. Carver JD, Pimentel B, Cox WI & Barness LA. Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics* 88:359-363, 1991.
 34. Uauy R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J Nutr* 124:157S-159S, 1994.
 35. McMillan JA, Oski FA, Lourie G. et al. Iron absorption from human milk, simulated human milk, and proprietary formulas. *Pediatrics* 60:896-900, 1977.
 36. Sánchez-Pozo A, Pita ML, Martínez A., Molina JA, Sánchez-Medina F. & Gil A. Effects of dietary nucleotides upon lipoprotein pattern of newborn infants. *Nutr Res* 6:763-771, 1986.
 37. Uauy R, G Stringel, R Thomas et al. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 10:497-503, 1990.
 38. Donovan SM & Lonnerdal B. Non-protein nitrogen and true protein in infant formula. *Acta Paediatr Scand* 78:497-504, 1989.
 39. Jenness R. Symposium: species variation in mammary gland function. Lactational performance of various mammalian species. *J Dairy Sci.* 69:869-885, 1986.
 40. Crane JK, Azar SS, Stam A & Newburg DS. Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *J Nutr* 124:2358-2364, 1994.
 41. Walstra P & Jenness R. Química y Física lactológica. Zaragoza, España, Ed. Acribia, 1987.
 42. ESPGAN Committee on Nutrition. Committee Report. Comment on the content and composition of lipids infant formulas. *Acta Paediatr Scand* 80:887-896, 1991.
 43. Carroll KK. Upper limits of nutrients in infant formulas: polyunsaturated and trans fatty acids. *J Nutr* 119:1810-1813, 1989.
 44. Widdowson EM. Upper limits of intake of total fat and polyunsaturated fatty acids in infant formulas. *J Nutr* 119:1814-1817, 1989.
 45. Clark KJ, Makrides M, Neumann MA & Gibson RA. Determination of the optimal ratio of linoleic acid to α -linolenic acid in infant formulas. *J Pediatr* 120:S151-158, 1992.
 46. Koletzko B & Bremer HJ. Fat content and fatty acid composition of infant formulas. *Acta Paediatr Scand* 78:513-521, 1989.
 47. Crawford MA. The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. *Am J Clin Nutr* 57 (suppl): 703S-710S, 1993.
 48. Schanler RJ. Human milk for preterm infants: nutritional and immune factors. *Semin Perinatol* 13:69-77, 1989.
 49. Martínez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 120:S129-138, 1992.
 50. Innis SM. Plasma and red blood cell fatty acid values as indexes of essential fatty acids in the developing organs of infants fed with milk or formulas. *J Pediatr* 120:S78-86, 1992.
 51. Uauy R, Birch E, Birch D & Peirano P. Visual and brain function in studies of n-3 fatty acid requirements of infants. *J Pediatr* 120:S168-180, 1992.
 52. Carlson SE, Cooke RJ, Rhodes PG, Peeples JM & Werkman SH. Effect of vegetable and marine oils in preterm infants formulas on blood arachidonic and docosahexaenoic acids. *J Pediatr* 120:S159-167, 1992.
 53. Jensen RG, Hagerty MM & McMahon KE. Lipids of human milk and infant formulas: a review. *Am J Clin Nutr* 31:990-1016, 1978.
 54. Allen JC, RP Kellerr, Archer P & Neville MC. Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *Am J Clin Nutr* 54:69-80, 1991.
 55. Barltrop D & Hillier R. Calcium and phosphorus content of transitional and mature human milk. *Acta Paediatr Scand* 63:347-350, 1974.
 56. Atkinson SA, Radde IC, Chance GW, Bryan MH & Anderson GH. Macro-mineral content of milk obtained during early lactation from mothers of premature infants. *Early Hum Dev* 4:5-14, 1980.
 57. Greer FR. Calcium, phosphorus, and magnesium: how much is too much for infant formulas? *J Nutr* 119:1846-1851, 1989.
 58. Lonnerdal B, Hoffman B & Hurley LS. Zinc and copper binding proteins in human milk. *Am j Clin Nutr* 36:1170-1176, 1982.
 59. Franson GB & Lonnerdal B. Distribution of trace elements and minerals in human and cow's milk. *Pediatr Res* 17:912-915, 1983.
 60. O'Dell BL. Mineral interactions relevant to nutrient requirements. *J Nutr* 119:1832-1838, 1989.
 61. Lonnerdal B. Trace element absorption in infants as a foundation to setting upper limits for trace elements in infant formulas. *J Nutr* 119:1839-1845, 1989.
 62. Dallman PR. Upper limits of iron in infant formulas. *J Nutr* 119:1852-1955, 1989.
 63. Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Chadudd P, López I & Amar M. Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. *Am J Clin Nutr* 43: 917-922, 1986.
 64. Pearson HA. Prevention of iron deficiency anemia: iron fortification of infant foods. En: Brain, behavior, and iron in the infant diet, J. Dobbing (Ed), p. 177-190. 1990.
 65. Archer MC & Tannenbaum SR. Vitamins. En: Nutritional and safety aspects of food processing. Marcel Dekker, Inc. (Ed), New York, USA, p. 47-95. 1979.
 66. Ziegler EE & Fomon SJ. Potential renal solute load of infant formulas. *J Nutr* 119:1785-1788, 1989.
 67. O'Donnell AM. Alimentación del niño normal. En: Nutrición infantil, O'Donnell AM Ed., Buenos Aires, Ed. Celcius, 1986.

Recibido: 14-02-1995

Aceptado: 01-08-1995

Desarrollo de un programa para la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad por ordenador

Ma. Carmen Rodríguez ¹, Ignacio Coupeau ², Jesús Larralde ³, y Alfredo Martínez J. ⁴

Universidad de Navarra, Pamplona, España

RESUMEN. La aplicación informática INFANDIET, confeccionada con el programa ToolBook, versión 1.53, que funciona dentro del entorno Windows, ha sido desarrollada para llevar a cabo una evaluación exhaustiva del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad. Este soporte, diseñado con programación orientada al objeto, para ordenadores PC/compatibles, utiliza un entorno gráfico y varios ficheros de DBase para la presentación y procesado de los datos. Este programa, específico para valorar el estado nutricional del niño, realiza distintas tareas: a) crear o actualizar la historia clínica de un niño, recogiendo datos personales, antecedentes obstétricos, antecedentes personales, desarrollo psicomotor, información psicosocial, salud dental, determinaciones antropométricas y confección de curvas de crecimiento, así como registro y evaluación de la ingesta dietética; b) ofrecer información sobre la confección de dietas en niños, permitiendo la actualización de la base de datos sobre alimentos del programa; c) recoger información sobre alimentación infantil; d) registrar la bibliografía empleada en la realización del programa.

SUMMARY. Development of a computer program to assess infant nutritional status. A computer program named INFANDIET has been designed with a Windows application (ToolBook software vs. 1.53), based upon object-oriented programming, and devised to assess the nutritional status of infants by using compatible computers PC. Additionally, it is a useful tool to elaborate personalized diets. This program has been developed to assist health professionals and students in the evaluation of the infant nutritional status by a) creating and managing clinical histories with anthropometrical, immunological and clinical data; b) showing infant dietary guidelines, with the ability to update the nutritional and food composition database of the program; c) giving information about infant nutrition; d) and presenting a complete list of references.

INTRODUCCION

La tecnología informática está influenciando numerosas facetas de la práctica en nutrición y dietética (1, 2). El empleo del ordenador en nutrición clínica, especialmente en la valoración del estado nutricional y en la estimación de dietas, permite un ahorro del tiempo dedicado a las operaciones aritméticas rutinarias, y facilita una mejor atención del paciente desde el punto de vista nutricional, ya que la información es protocolizada y protegida, y al ser los ordenadores cada vez más económicos, su uso está muy extendido.

Los programas informáticos comercializados en el campo

de nutrición, generalmente están diseñados para la estimación de la composición de las dietas en adultos (3-5), y son muy escasos los utilizados en nutrición pediátrica. En algunos servicios de neonatología se emplean protocolos informatizados para llevar a cabo el seguimiento del paciente y la confección de los informes de alta de cada niño (6,7). Otras aplicaciones informáticas incluyen bases de datos con alimentos destinados a la alimentación del niño que posibilitan estimar la composición de su dieta (8).

La valoración del estado nutritivo del niño durante los primeros meses de vida es crítica y tiene un extraordinario interés (9). Así, los requerimientos nutritivos están aumentados, ya que el crecimiento y desarrollo son muy rápidos; pero al mismo tiempo, la tolerancia digestiva y metabólica a una alimentación inadecuada está reducida, debido a que la capacidad funcional de los órganos que intervienen en el metabolismo no está totalmente desarrollada (10).

1 Profesor Ayudante

2 Director del Centro de Tecnología Informática

3 Profesor Emérito de Fisiología

4 Catedrático de Nutrición

Por todo ello, se ha diseñado un programa informático que funciona en un entorno ampliamente difundido (Windows), destinado a la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad, que permite valorar su ingesta dietética y que incluye aspectos de la nutrición del niño relacionados con la lactancia materna y los productos destinados a su alimentación.

Este programa permitirá detectar posibles situaciones de malnutrición, así como prevenir y evitar trastornos nutritivos que pueden ser la causa de afecciones posteriores en el adulto. Asimismo, esta aplicación puede ser utilizada en la enseñanza asistida por ordenador y para la formación continuada de especialistas en nutrición.

MATERIAL Y METODOS

En la elaboración de esta aplicación informática sobre nutrición pediátrica se han utilizado distintos datos de referencia, recogidos en los diferentes apartados en que se ha organizado el programa. El apartado de historias incluye las curvas y tablas de crecimiento para niños/as de 0 a 2 años correspondientes al peso, longitud, perímetro craneal y pliegue tricípital, editadas por el Instituto de Investigación sobre crecimiento y desarrollo de la Fundación F. Orbeagozo de España (11). En las pruebas bioquímicas los valores de referencia registrados corresponden a cifras de uso generalizado en pediatría (12). Las recomendaciones de energía y nutrientes diarias para niños hasta los tres años de edad corresponden a las Recommended Dietary Allowances (RDAs) confeccionadas por el Comité de Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (13), y las cifras que indican el gasto metabólico basal diario hasta los tres años, según la edad y el sexo del niño, son de uso reconocido en diferentes poblaciones pediátricas (14).

En la sección de la dieta, los datos de composición de las fórmulas infantiles y de los alimentos preparados envasados proceden de distintas casas comerciales (15) y para indicar la composición de los alimentos crudos se ha utilizado la tabla de composición de alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (16), ya que recoge alimentos de ingesta frecuente en la población española. De igual forma, los intercambios empleados proceden de las listas de intercambios para la confección de dietas de la Asociación Americana de Diabéticos (17).

En el apartado de información adicional, las recomendaciones relativas a la composición de las fórmulas infantiles provienen de distintos organismos internacionales como la Sociedad Europea de Nutrición y Gastroenterología Pediátrica (ESPGAN) que ofrece información nutricional complementaria para las fórmulas de inicio, fórmulas de seguimiento, fórmulas de inicio con proteínas de soja, fórmulas de seguimiento con proteínas de soja, cereales y otros alimentos (alimentos preparados envasados, sopas, platos completos, etc) (18-22); la Unión Europea (EU), con recomendaciones

referentes a preparados para lactantes elaborados con proteínas de leche de vaca, preparados para lactantes elaborados con proteínas de soja y preparados de continuación (23), y las directrices de la Asociación Americana de Pediatría (AAP) respecto a los aportes nutritivos aconsejados para leches artificiales infantiles (24, 25).

Para el desarrollo del programa se ha confeccionado una base de datos de alimentos que recoge la composición de 484 productos empleados frecuentemente en alimentación infantil. Los alimentos registrados se han clasificado en fórmulas infantiles, alimentos crudos y alimentos preparados envasados.

El equipo utilizado en la realización de este trabajo ha sido un ordenador personal PC/compatible, con un microprocesador 486 y disco duro. El ordenador ha dispuesto de un monitor en color, con tarjeta gráfica, y estaba conectado a una impresora láser.

Como sistema operativo se ha empleado el programa Microsoft MS-DOS, versión 5.0 y el programa Microsoft Windows, versión 3.1. El software utilizado en la realización de esta aplicación corresponde al programa ToolBook, versión 1.53 que opera dentro del entorno Windows.

La metodología usada en la realización de esta aplicación es programación orientada al objeto. El lenguaje de programación empleado es OpenScript, y se han creado y utilizado ficheros de DBase a través de distintas funciones de las Dynamic Link Libraries (DLLs) del programa ToolBook (26, 27). Este programa se presenta en tres discos flexibles de 3.5 pulgadas, ocupa un espacio total de 1811305 Kilobytes, y está constituido por 126 pantallas.

RESULTADOS Y DISCUSION

El programa informático INFANDIET puede ser empleado en la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad. Asimismo, contiene una gran cantidad de información sobre nutrición y alimentación infantil, que se muestra en pantalla en español.

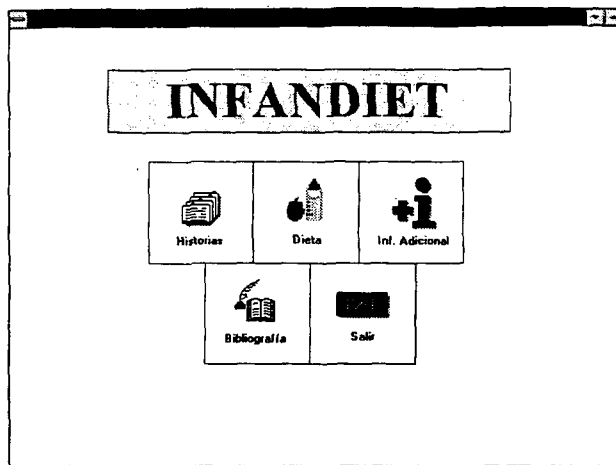
Al realizar esta aplicación, siempre se ha tenido en cuenta el usuario potencial, es decir, un profesional con ciertos conocimientos en nutrición infantil, que no tiene necesariamente una formación previa en informática. Por eso, la estructura y organización del programa es muy sencilla, y así aparecen distintos iconos a lo largo del programa con formas y colores característicos relacionados con la tarea que llevan a cabo. Este programa muestra las ventajas de la utilización del entorno gráfico Windows, que permite la estructuración automática de la información en menús y páginas de fácil manejo (28).

Esta aplicación ha sido ensayada repetidamente con datos de individuos reales, hasta que sus resultados han sido satisfactorios. En principio, su operatividad ha permitido solventar todos los problemas detectados. Aunque el programa ha sido diseñado para una pantalla gráfica con colores, también puede ser empleado con un monitor monocromo, lo que demuestra la gran versatilidad de esta aplicación.

Este programa tiene un menú principal que consta de cinco apartados: historias, dieta, información adicional, bibliografía y salida del programa. Estos aspectos han sido considerados porque llevan a cabo tareas relativamente independientes, pero complementarias, en la valoración del estado nutricional y alimentación del lactante y del niño corta edad, y en lo que a programación se refiere, cada uno permite la creación de un bloque diferente, de fácil y rápido acceso.

Las pruebas de fiabilidad, flexibilidad, robustez, confidencialidad, visibilidad, precisión y adaptación a diferentes modelos de PC han resultado óptimas en el curso de su evaluación técnica por el centro de Tecnología Informática de nuestra Universidad, durante un período de seis meses. El destino prioritario de este programa consiste en su aplicación en actividades sanitarias y docentes, por lo que su distribución será amplia y su costo módico para instituciones no lucrativas.

FIGURA 1
Pantalla con el menú principal del programa



1. Historias: El apartado de historias del programa permite registrar la historia clínica de cada niño, obtener esta historia impresa y confeccionar un listado actualizado de las historias clínicas de los niños registrados en el programa. La historia clínica del niño recoge once aspectos distintos, representados por un icono característico, que posibilitan la evaluación del estado nutricional del niño, con índices clínicos, referencias dietéticas, valores de la composición corporal y, por último, determinaciones bioquímicas e inmunológicas (29). El programa muestra un listado con todos los pacientes atendidos, ordenados por su número de historia, y con la fecha de la última visita, lo que supone un gran ahorro de tiempo para el especialista, por la rapidez de esta aplicación, y permite un acceso fácil a los datos de cada niño (30). Los distintos aspectos incluidos en el apartado de historias son:

Datos personales: Registra los datos de filiación y las características de la alimentación del niño. El conocimiento del momento de introducción/abandono de los distintos productos empleados en su alimentación puede servir para recomendar, si es necesaria, la ingesta de suplementos y evitar los inconvenientes que puede producir una introducción precoz de los alimentos en la dieta (31).

Antecedentes obstétricos: Incluye características del embarazo y del desarrollo del parto que pueden influir en el posterior crecimiento del niño (32).

Desarrollo psicomotor: Recoge la evolución de distintas funciones psicomotoras en el niño. El programa registra el momento a partir del cual el niño es capaz de realizar unas funciones psicomotoras básicas, ya que un retraso importante en la aparición de alguna de ellas puede ser indicativo de alguna patología, quizás de origen nutricional (33). Las distintas funciones recogidas están enunciadas de forma clara y sencilla, para facilitar el uso del programa al usuario.

Salud dental: Muestra la dentición del niño, utilizando un dibujo gráfico para representar las piezas dentales de la cavidad bucal, similar al que aparece en las historias pediátricas consultadas. El momento de la aparición de los dientes, y las características de las piezas dentales influyen directamente en la alimentación del niño; por ello, esta información ha sido incluida en el programa (34).

Bioquímica: Permite recoger el valor de distintas pruebas bioquímicas como pruebas hematológicas e inmunológicas, determinaciones relacionadas con el metabolismo de proteínas (35), pruebas para estimar el metabolismo de los hidratos de carbono, determinaciones del metabolismo de lípidos y pruebas relacionadas con el metabolismo de los minerales y vitaminas. Las determinaciones bioquímicas son usadas con el fin de detectar estados de carencias subclínicas de nutrientes y constituyen un método objetivo de valoración del estado nutricional, independiente de factores subjetivos y emocionales (36). Los criterios de selección de las pruebas bioquímicas incluidas en este programa están basados en la sencillez de las determinaciones y su utilidad en la práctica. Para evitar la obtención de resultados erróneos, el programa indica las unidades en que se expresan los resultados de las diversas determinaciones y muestra unos valores de referencia para cada prueba. La elección de unos valores de referencia adecuados y fiables ha resultado una labor costosa y ha precisado un tiempo importante, ya que no hay uniformidad de criterios al respecto.

Exploración física: Considera las características de distintas zonas y sistemas corporales del niño como aspecto general, aspecto de la piel, cabeza, ojos, boca y aparato respiratorio, aparato circulatorio, abdomen, aparato locomotor,

ano, genitales y sistema nervioso. Las características recogidas por el programa en cada sistema corporal son concretas y están enunciadas de forma clara y sencilla. Estas características han sido elegidas tras estudiar varias historias médicas de distinta procedencia y se han incluido las reseñadas por ser bastante representativas en cada caso del estado de las diferentes zonas corporales, aunque siempre pueden completarse con más cuestiones en versiones posteriores del programa.

Antecedentes personales: Registra datos del niño correspondientes a distintas situaciones posibles anteriores como enfermedad cardiovascular, enfermedad hepática, enteropatías, enfermedad renal, diabetes, problemas metabólicos, enfermedad psicomotriz, alergias, procesos quirúrgicos, otras patologías y fármacos administrados al niño. Este apartado en el programa aparece recogido en tres pantallas para evitar reunir demasiada información en una sola pantalla. Algunas patologías, directamente relacionadas con la alimentación del niño y muy frecuentes en la infancia, han sido tratadas con más minuciosidad. El registro pormenorizado de los fármacos que son administrados al niño es importante, ya que un tratamiento farmacológico prolongado puede causar alteraciones en el estado nutricional del niño (37).

Información psicosocial: Recoge distintos aspectos relacionados con el entorno social donde vive el niño. Aspectos socioeconómicos y psicológicos, tales como la formación cultural de los padres, especialmente de la madre, características de la vivienda y relaciones interfamiliares deben tenerse en cuenta a la hora de valorar el estado nutricional del niño (38).

Antropometría: Permite el registro y actualización de distintas determinaciones antropométricas del niño como peso, longitud, perímetro craneal y pliegue tricípital; facilita el cálculo del valor Z a partir de estos datos; y posibilita la obtención en forma automática de las curvas de crecimiento para estas medidas, a lo largo del tiempo, tanto en pantalla como por impreso en unidades convencionales de peso, longitud y de valor Z. Estas curvas de crecimiento constituyen un método sencillo para evaluar el crecimiento del niño. Entre los programas consultados se han encontrado distintos protocolos informatizados, que emplean estas curvas y los valores antropométricos correspondientes (39-42). Este programa ofrece la ventaja única de ofrecer una copia impresa de cada una de las curvas de crecimiento con los valores registrados del niño, y mostrar una pantalla con los valores de referencia para las diferentes medidas, que pueden ser rápidamente adaptados a las características de la población de referencia (36). En versiones posteriores del programa son fáciles de incluir otras variables antropométricas, como el perímetro del brazo y otros pliegues cutáneos para determinar de forma más completa la composición corporal de los niños.

Análisis de la dieta: Posibilita recoger la historia dietética del niño, estimar la composición de un alimento y de una dieta completa, conocer las recomendaciones nutricionales del niño, comparar la ingesta dietética con las recomendaciones y conocer el gasto energético. Los alimentos se han clasificado en tres grupos, fórmulas infantiles, alimentos crudos y preparaciones envasadas, y a su vez dentro de cada grupo se distinguen subgrupos ordenados alfabéticamente, para facilitar la elección de alimentos por el usuario.

Los alimentos seleccionados aparecen registrados en la tabla de dieta, siendo posible conocer la composición de un alimento referida a la cantidad ingerida y conocer la composición detallada de la dieta completa.

La indicación de la composición de un alimento es una característica de los programas de análisis de nutrientes, pero algunos programas sólo indican la composición de un alimento referida siempre a la cantidad que aparece registrada en la base de datos y no a la cantidad de alimento propiamente ingerida, como en esa aplicación.

Algunos nutrientes que aparecen en la pantalla de la composición de la dieta vienen seguidos de un asterisco (*) para indicar que no se dispone del dato de ese nutriente en todos los alimentos incluidos en la dieta del niño. Este aspecto no ha sido considerado en la mayoría de los programas consultados, pero ha sido incluido en esta aplicación, porque puede servir para evitar errores en calibración de la dieta del niño por datos perdidos. El programa muestra la comparación entre la ingesta dietética y las recomendaciones nutricionales en forma gráfica y numérica, como en la mayoría de los programas existentes, para facilitar la comprensión de los resultados y detectar fácilmente posibles deficiencias.

Vacunas: Permite registrar las vacunas recibidas por el niño y su fecha de administración, conocer el calendario de vacunas recomendado, y registrar y valorar la prueba tuberculínica. El usuario de esta aplicación puede registrar la historia de vacunaciones del niño y comparar la fecha en que el niño recibe una vacuna y la fecha de administración recomendada. La consideración de este aspecto, de gran interés en determinadas circunstancias para evaluar el estado nutricional del niño, es novedosa ya que no ha sido encontrada en otras aplicaciones informáticas.

2. Dieta: El apartado de dieta permite revisar y completar la base de datos con la composición de los alimentos del programa y tener acceso a distinta información nutricional, sin precisar el registro de la historia clínica de un niño. Este apartado incluye cuatro opciones.

Alimentos: Posibilita conocer la composición de un alimento referida a 100 g ó a 100 ml, según el tipo de producto, y añadir nuevos alimentos a la base de datos. La posibilidad de completar la base de datos añadiendo la composición de

distintos alimentos confiere al programa una gran flexibilidad y permite al usuario personalizar su programa al incluir los alimentos que estime más oportunos. Esta capacidad de completar y editar la base de datos existe en varios de los programas informáticos consultados, siendo uno de los criterios de calidad al evaluar un programa informático (43).

Intercambios: Registra alimentos equivalentes en cuanto a su valor nutritivo, incluidos en distintos grupos, leche sin grasa, leche semidesgrasada, leche entera, pan y cereales, carne magra, carne con grasa normal, carne rica en grasa, grasas, verduras y frutas. Este sistema garantiza una gran versatilidad al confeccionar las dietas. Algunas aplicaciones informáticas utilizan los intercambios de forma operativa para la creación de menús y otras incluyen este apartado a título informativo, según el objetivo del programa. Este programa ofrece la ventaja de que muestra las listas de alimentos intercambiables de una forma clara y sencilla, con la ayuda de gráficos y campos capaces de registrar una gran cantidad de información, evitando de esta forma los listados rutinarios.

Dietas confeccionadas: Permite el registro en pantalla y por impreso de diferentes prescripciones dietéticas corrientemente seguidas por el usuario. Muchas veces la utilización de un soporte informático en nutrición clínica es criticada por la impersonalización y automatismo que puede suponer la recogida rutinaria de los mismos datos en distintos pacientes (44). Por esta razón, el usuario en este apartado puede indicar todos los comentarios que estime oportunos respecto a las características de distintas dietas y registrar dietas personalizadas, lo que no es frecuente en los programas actualmente disponibles.

Pautas dietéticas: Recoge algunas generalidades dietéticas en situaciones como alergias alimentarias, enfermedad celiaca, estreñimiento, diabetes, diarreas, fenilcetonuria, intolerancia a la lactosa, intolerancia a las proteínas de la leche de vaca, y recién nacidos de bajo peso, cuyo diagnóstico ha sido establecido previamente por el facultativo correspondiente. Los criterios para la elaboración de estas pautas se han basado en los conocimientos científicos actualmente aceptados (9, 10, 32). El tratamiento de esta aspecto es muy breve en esta aplicación, ya que el objetivo del programa es valorar el estado nutricional del lactante y del niño de corta edad sano, pero en la infancia son frecuentes las situaciones que precisan medias dietéticas especiales, como las recogidas en este programa. Además, este aspecto permite la adaptación a diferentes criterios clínicos en situaciones específicas o circunstanciales, brindando una posibilidad original de uso de esta aplicación informática.

FIGURA 2
Pantalla de historias del programa

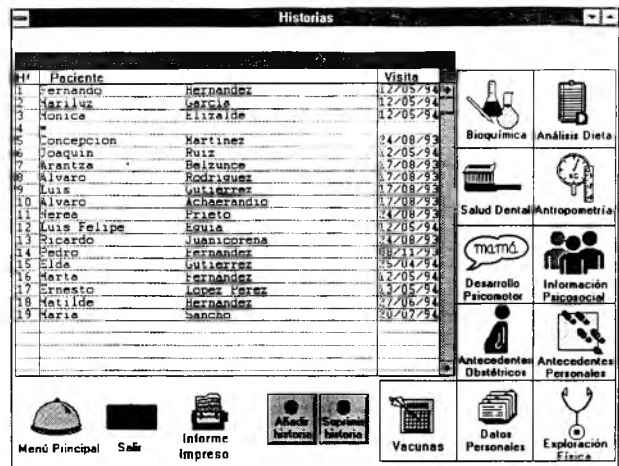
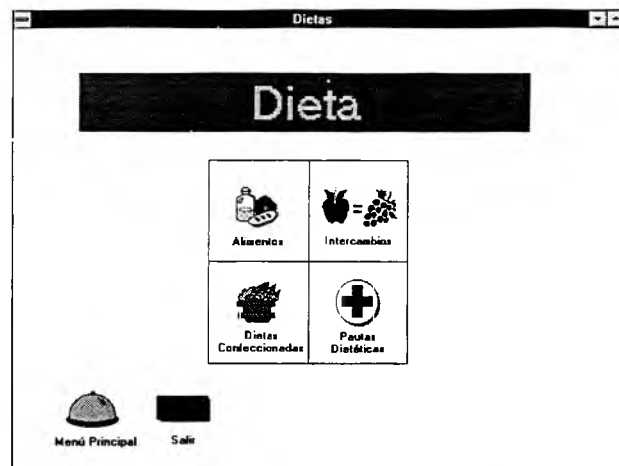


FIGURA 3
Pantalla de dieta del programa



3. Información adicional: El apartado de información adicional registra distintos aspectos donde se ofrece información relacionada con la alimentación del niño en las primeras épocas de la vida. Una de las ventajas que ofrece la utilización de este soporte informático es poder manejar un gran volumen de información y mostrarla al especialista en nutrición de una forma interactiva y rápida y así, contribuir a su formación (45, 46). Esta es la razón por la que se incluye este apartado, con el fin de almacenar información importante para el profesional de la salud y a su vez, incluir algunas pautas sobre la alimentación del niño para facilitar el aprendizaje del especialista y ofrecer unos consejos nutricionales al usuario en general, resultando muy útil en la enseñanza asistida por ordenador para profesionales de la salud. Los aspectos tratados corresponden a:

Lactancia materna: Registra las características básicas de este tipo de alimentación y situaciones en que está desaconsejada, su composición en comparación con la de la leche de vaca, y fármacos que pueden pasar a la leche materna. El conocimiento y la adecuación de los patrones de lactancia natural en la población, con la ayuda de este programa, puede servir para la instauración posterior de programas nutricionales comunitarios (47).

Recomendaciones: Recoge características actualizadas de la composición de productos destinados a la alimentación infantil indicadas por la Sociedad de Nutrición y Gastroenterología Pediátrica (ESPGAN), la Academia Americana de Pediatría (AAP), y la Unión Europea (EU). La consulta, recopilación y actualización de esta información nutricional puede resultar una labor tediosa. Sin embargo, la organización estructurada de estos datos en el programa permite el acceso a ellos de forma rápida y sencilla, y su registro informatizado constituye una innovación entre los programas consultados.

Introducción de alimentos: Muestra el régimen dietético del lactante durante el primer año de vida, utilizando las ventajitas que ofrece el uso de un entorno gráfico.

Interacciones fármaco-nutriente: Considera las posibles acciones de distintos fármacos sobre algunos nutrientes. Entre los programas de nutrición consultados, prácticamente ninguno incluye este aspecto, excepto uno que posee un apartado que ofrece las características de interacción fármaco-nutriente para el profesional y para el usuario en general (48).

el usuario en cualquier momento y así actualizar sus conocimientos de nutrición.

5. Salida del Programa: El apartado Salir del menú principal permite abandonar el programa y volver directamente al sistema operativo.

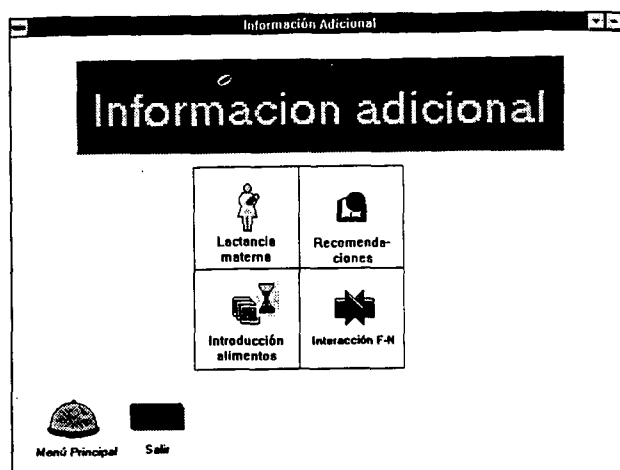
Además, se ha diseñado un manual de usuario de 22 páginas, completo y ordenado, que facilita el empleo del programa. La secuencia lógica y estructurada de las pantallas de esta aplicación garantiza el óptimo uso del programa en todo momento, aunque no se disponga del manual del usuario.

Este programa ha sido utilizado de forma experimental por un grupo de estudiantes de segundo curso de la diplomatura de Dietética y Alimentación Humana, en las sesiones prácticas de la asignatura de nutrición infantil. Los resultados obtenidos en cuanto a comprensión de los distintos conceptos han sido excelentes, observándose alguna dificultad al principio en el manejo del programa, debido al escaso conocimiento en algunos alumnos del entorno informático.

La aplicación informática INFANDIET destinada a la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad en forma global, incluyendo a su vez la evaluación de la ingesta dietética, permite conocer el grado de salud del niño, y las conclusiones que se alcanzan a través de esta evaluación nutricional completa, las cuales pueden ser la base para el desarrollo de programas de salud nutricional, para el planteamiento de los cuidados necesarios en la alimentación infantil y para la instauración de un asesoramiento nutricional adecuado. Este programa es rápido, de gran utilidad y versátil, con una esmerada presentación de la información en pantalla, lo que posibilita su empleo en la enseñanza asistida por ordenador. Esta aplicación constituye una innovación en su campo porque no se han encontrado programas en lengua castellana cuyo objetivo principal sea valorar el estado nutricional del niño en las primeras épocas de la vida, y que incluyan, a su vez, diversos aspectos recientes y actualizables sobre nutrición infantil.

FIGURA 4

Pantalla de información adicional del programa



4. Bibliografía: El apartado de bibliografía incluye un listado con las principales referencias bibliográficas utilizadas en la confección del programa, que puede ser completado por

REFERENCIAS

1. Barbusca A. Customizing mainframe computer software to improve the productivity of clinical dietetics. *J Am Diet Assoc* 93:682-683, 1993.
2. Herckerg S., Briancon S., Favier A., Galán P., Malvy D., Preziosi P. & Roussel A.. Le Projet SU.VIMAX/100 000 Volontaires pour la recherche en nutrition dans le domaine de la prévention. *Cah Nutr Diet* 38:54-64, 1993.
3. Fichtner R., Sullivan K. & McPherson S.. The uses of software in nutrition analysis workshop. *Arch Latinoam Nutr.* 42(3 Suppl):137S-138S, 1992.
4. Rodríguez MC, Rodríguez-Mariscal MJ, Martínez JA & Larralde J. Programa informático para la valoración del estado nutritivo y la confección de dietas en adultos. *Nutr. Hosp* 7:215-219, 1993.
5. Rodríguez MC, Larralde J. & Martínez JA. Usos y aplicaciones

- de programas informáticos en nutrición y dietética *Nutr Clin* 14:29-36, 1994.
6. Aldámiz-Echevarría J., Emparanza E., Pérez A. & Cortajarena M.. Valoración del estado nutricional en pediatría mediante microordenador. *Nutr Hosp* 2:32-37, 1987.
 7. Giambruno F., O. Failache, Iturralde A. & Peña JL. Historia neonatal para uso en la asistencia y la docencia. *Arch Pediatr Uruguay* 65:35-38, 1994.
 8. Nutter Pinn vs 1.0 (programa informático), 1993.
 9. Hernández M. Nutrición infantil. En: Fundación BBV (eds). Aspectos de la Nutrición del Hombre, p. 131-150. 1992.
 10. Fomon SJ. Nutrición del lactante. México, Ed Mosby-Doyma, 1995.
 11. Hernández M. Instituto sobre crecimiento y desarrollo. Curvas y tablas de crecimiento. Bilbao, Fundación F. Orbegozo, 1991.
 12. Cruz M. Tratado de Pediatría. Vol II y II. Barcelona, Ed. Espaxs, 1993.
 13. RDAs. Recommended Dietary Allowances. National Research Council. 10th edition. New York, National Academy Press, 1989.
 14. Benedict FG & Talbot FB. Metabolism and growth from birth to puberty. Washington The Carnegie Institution of Washington, 1921.
 15. Nogales A. Vademecum de Dietética Infantil. 2ª edición. Madrid, Ed CEA, 1989.
 16. Moreiras O., A. Carbajal & Cabrera ML. La composición de los alimentos. Madrid, Ed Eudema, 1992.
 17. American Diabetes Association and American Dietetic Association. Exchange lists for meal planning. Alexandria, VA and Chicago, IL 1986.
 18. ESPGAN, European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Committee on nutrition: Guidelines on infant nutrition. I. Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scand Suppl* 262, 1977.
 19. ESPGAN, European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Committee on nutrition. II. Recommendations for the composition of follow-up formula and beikost. *Acta Paediatr Scand Suppl* 287:1-25, 1981.
 20. ESPGAN, European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Committee on nutrition. Comment on the composition of cow's milk based follow-up formulas. *Acta Paediatr Scand* 79:250-254, 1990.
 21. ESPGAN, European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Committee on nutrition. Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. *Acta Paediatr Scand* 80:887-896, 1991.
 22. ESPGAN, European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Committee on nutrition. Comment on the composition of soy protein based infant and follow-up formulas. *Acta Paediatr Scand* 79:1001-1005, 1990.
 23. Directiva del Consejo 91/321/CEE, de 14 de Mayo de 1991. Diario Oficial de las Comunidades Europeas N° L175 de 4 de julio de 1991, p.35-49, 1991.
 24. AAP, American Academy of Pediatrics. Committee on nutrition. Cometary on breastfeeding and infant formulas, included proposed standards for formulas. *Pediatrics* 57:278-285, 1976.
 25. AAP, American Academy of Pediatrics. Committee on nutrition. Soy-protein formulas: Recommendations for use in infant feeding. *Pediatrics* 72:359-362, 1983.
 26. Asymetrix Corporation. Using ToolBook. A guide to building and working with books. Washington, Asymetrix Corporation, 1989.
 27. Asymetrix Corporation. Using OpenScript. An introduction and reference to the OpenScript language. Washington, Asymetrix Corporation, 1981.
 28. Figueredo M. Programa para la elaboración de dietas y estudios de nutrición. Diario Médico, p.20, 1993.
 29. Poskitt EME. Nutrición Pediátrica Práctica. Zaragoza, Ed Acribia, 1992.
 30. Paricio J., Salom A. & De Castro P. Diagnósticos en pediatría extrahospitalaria. Una experiencia informatizada de seis años. *An Esp Pediatr* 34:451-453, 1993.
 31. Pérez R., Román R., Mejía LA & Dewey KG. Infant feeding practices among low-income Mexican urban women: A four month follow-up. *Arch Latinoam Nutr.* 42:259-267, 1992.
 32. Campbell DM. Maternal and fetal nutrition. En: Mc Laren DS, Burman D., Betton NR & Williams AF (eds). Textbook of Paediatric Nutrition. 3th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1991.
 33. Mancebo M. Efectos de un tratamiento adecuado sobre las alteraciones de la conducta y desarrollo psicomotor en lactantes con carencia de hierro. *Arch Pediatr Uruguay* 65:39-44, 1994.
 34. Stevenson RD & Allaire J.. El desarrollo de la alimentación y deglución normales. *Clin Pediatr Nort* 6:1475-1491, 1991.
 35. Viteri FE & Alvarado J.. The creatinine height index: its use in the estimation of the degree of protein depletion and repletion in protein calorie malnourished children. *Pediatrics* 46:696-706, 1970.
 36. Gibbon RS. Principles of nutritional assessment. Oxford, Oxford University Press, 1990.
 37. Requejo A. & Moran J. Interacción fármaco-nutriente-fármaco: ¿una nueva forma de déficit nutricional en la infancia? *Arch Pediatr* 42:300-310, 1991.
 38. Fianza F. Nutritional status assessment. A manual for population studies. First edition. London, Ed Chapman & Hall, 1991.
 39. Natal A. Valoración del peso y la talla utilizando un microordenador. *An Esp Pediatr* 27:169-172, 1987.
 40. García-Diz L., Goñi I. & Varela G. Aplicación del cálculo de valores antropométricos mediante microprocesador al diagnóstico nutricional. *Arch Latinoam Nutr.* 35:48-62, 1985.
 41. Goñi I. & García-Diz L.. Método para el cálculo en ordenadores personales de los valores esperados de variables antropométricas sobre composición corporal. *Arch Latinoam Nutr* 35:232-246, 1985.
 42. Martínez H. Desarrollo de un sistema de lectura óptica para la vigilancia epidemiológica del estado nutricional en la infancia. *Mapfre Med* 5:123-125, 1994.
 43. Dwyer J. & West C. Caveat emptor: Assessing needs evaluating computer options. *J Am Diet Assoc* 84:302-312, 1984.
 44. Spencer S.A. Computerized neonatal information systems. *Arch Dis Child* 60:823-826, 1991.
 45. Bernard J. Computers in medical education: information and knowledge management, understanding and learning. *Hum Pathol* 21:998-1002, 1990.
 46. De Oliveira J.E. New pathways for teaching about food and nutrition. *Arch Latinoam Nutr* 42(3 Suppl): 102S-107S, 1992.
 47. Pérez R. Patrones de la lactancia natural en América Latina y el Caribe. *Bol Of Sanit Panam* 115:185-194, 1993.
 48. Food Medication Interaction vs 1.0 (programa informático), 1993.

Recibido: 10-02-1995

Aceptado: 07-08-1995

Indicadores braquiales de grasa y músculo de escolares de una comunidad rural según el grupo social (General Lavalle, Buenos Aires, Argentina)

Andrés Guillermo Bolzán¹ y Luis Manuel Guimarey²

RESUMEN. Con el objeto de obtener datos de la composición corporal de escolares de la comunidad rural de General Lavalle, Buenos Aires, Argentina, se efectuó un estudio transversal de indicadores braquiales y se consideró además el efecto de la ocupación y educación de los padres sobre los indicadores antropométricos. Se midieron el perímetro braquial (PB) y el pliegue cutáneo tricipital (PT) calculándose el área muscular braquial (AM). Los datos se convirtieron a score z. Los niveles educativo y ocupacional de los padres se combinaron en 7 grupos sociales. Se efectuó un ANOVA factorial y test de Tukey. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en el PB y el PT ($p < 0.001$) según el grupo social. Los niños evidenciaron dos patrones de composición braquial de acuerdo al grupo social. Los resultados indicarían: efecto del grupo social sobre la composición braquial y diferencias en dicha composición con respecto a poblaciones urbanas de similares características genéticas y étnicas.

SUMMARY. Brachial indicators of fat and muscle in a rural community according to social groups. General Lavalle, Bs. As. Argentina. In order to determinate the body composition in a schoolchildren rural community - General Lavalle, Buenos Aires, Argentina- the arm circumference (AC) and the triceps skinfold (TS) growth were studied by cross-sectionally methods. From those measurements the arm muscle area was calculated. All the data were transformed to «z» scores. The sample was divided into seven social groups according to the educational and occupational levels of parents. Statistics analysis of variance (ANOVA test) and Tukey test were performed. Statistically significant differences in AC and TS among the social groups were observed ($p < 0.001$). Two different patterns of brachial composition were observed according to the social group. This composition was different with respect to urban populations. Our findings suggest an enviromental adaptation by growth.

INTRODUCCION

La función primaria de socialización que opera en la familia establece un vínculo entre la cultura del grupo y los infantes, configurándose un ecosistema familiar que actúa fuertemente sobre el crecimiento de los niños (1,2). Por otra parte, el crecimiento físico es un buen indicador de salud y estado nutricional de una comunidad (3).

En el ser humano el crecimiento ocurre durante un extenso período de la vida, otorgándole una importante capacidad de modelación en la composición, tamaño y forma corporal (4). En ecosistemas desfavorables dicha capacidad modeladora posibilita la emergencia de procesos adaptativos. Se ha de-

mostrado en diversas investigaciones (5,10) no sólo déficit de crecimiento, sino también modificaciones en composición corporal de los niños de hogares de bajos recursos socioeconómicos.

El uso de medidas braquiales en la estimación de la composición corporal es ampliamente aceptado y se justifica su empleo en estudios epidemiológicos por su practicidad operativa (11). El perímetro del brazo (PB) incluye músculo y tejido graso. La medición del pliegue cutáneo permite discriminar la grasa y realizar el cálculo indirecto del componente muscular braquial. Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el pliegue cutáneo tricipital (PT) y la estimación de la reserva grasa por densitometría, conductibilidad eléctrica u otras mediciones antropométricas (12-17). Asimismo, la medición braquial del músculo ha sido empleada en varios estudios como reflejo de la reserva protéica, correlacionándose con la excreción de creatinina y estimaciones de la masa muscular total por otras técnicas (18-20). Cuando

1 Jefe del Departamento de Acción Social, Dirección de Salud de la Municipalidad de General Lavalle, Buenos Aires, Argentina.

2 Investigador de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.. Unidad de Endocrinología y Crecimiento. Hospital de Niños «S.S.M. Ludovica» de La Plata.

existe un déficit nutricional, los componentes graso y magro se reducen en ese orden. En primer lugar, el niño pierde peso, reserva energética y de continuar la noxa, el componente muscular -reserva proteica- comienza a ser utilizado en el mantenimiento del metabolismo (21).

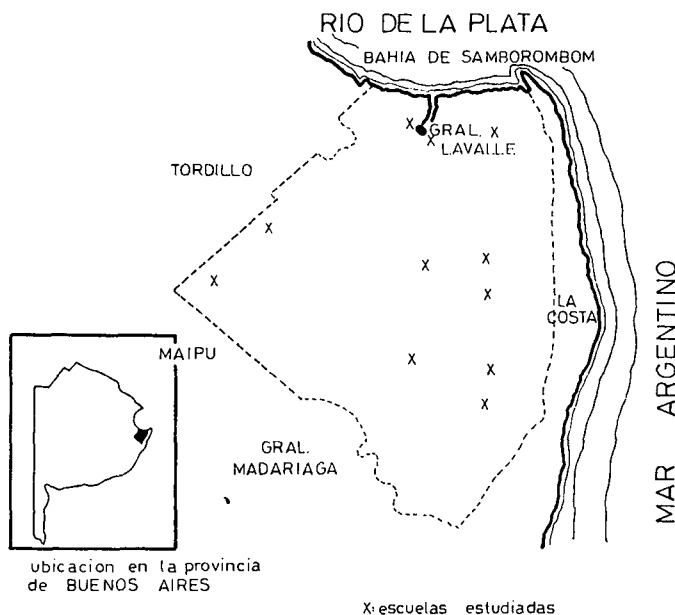
El propósito del presente trabajo fue obtener datos de la composición corporal a partir de medidas braquiales, de escolares integrantes de la comunidad rural de General Lavalle, Provincia de Buenos Aires, Argentina, y evaluar su distribución acorde a los niveles educativos y ocupacionales de los padres.

MATERIAL Y METODOS

El Distrito de General Lavalle, ubicado en la Provincia de Buenos Aires, Argentina, constituye una comunidad rural de 3.065 habitantes (1.675 varones y 1.390 mujeres) distribuidos en 2.600 Km², con una densidad poblacional de 1,2 hab/Km². La principal actividad económica de la región es la cría de ganado vacuno y ovino, y en menor medida el cultivo de cereales (Fig. 1)

FIGURA 1

Mapa del Municipio de General Lavalle
(PCIA. Buenos Aires)
Distribución de las escuelas estudiadas



Fue evaluado el 80% de los niños con matrícula escolar del Municipio: 179 varones y 134 mujeres comprendidos entre los 6 y 13 años de edad.

La composición corporal se infirió a partir de mediciones braquiales: PB y PT y el cálculo del área muscular braquial (AM) con la fórmula de Frisancho (22):

$$AM = \frac{(PB - 3,1416 \times PT)^2}{4 \times 3,1416}$$

Los datos se convirtieron a score z (23) usando como referencia la población estudiada por Frisancho (22).

Debido a que la distribución de las medidas braquiales tiende a ser asimétrica los score z fueron calculados con las hemidistribuciones superior e inferior en relación a la mediana. Todas las medias fueron relevadas por el mismo observador (A.B.) siguiendo normas estandarizadas por la Sociedad Argentina de Pediatría (24).

Variables Sociales: fueron determinados los niveles educativo y ocupacional de los padres. En el análisis se tuvo en cuenta: el nivel educativo el correspondiente a la madre, ya que es quien pasa mayor tiempo con el niño; y para el nivel ocupacional se consideró el trabajo mejor remunerado entre ambos. Los niveles fueron codificados de la siguiente manera:

Nivel Educativo: I: instrucción primaria incompleta, II: instrucción primaria completa, III: instrucción secundaria completa.

Nivel ocupacional: I: trabajador temporario, II: empleado en relación de dependencia, III: propietario.

Se combinaron los datos de nivel educativo y ocupacional designándose las combinaciones posibles como Grupos Sociales.

El análisis estadístico incluyó un ANOVA factorial con test de rangos múltiples de Tukey, así como una prueba de asociación entre las variables sociales (test de Chi-cuadrado) y el cálculo de un coeficiente de correlación no paramétrico (Tau B de Kendall). Debido al N pequeño de esta comunidad, en el análisis epidemiológico del efecto del grupo social se unificó a la edades y los sexos expresando las medidas braquiales en score z. No obstante, a fin de verificar el efecto del sexo y la edad, se realizó un ANOVA factorial agrupando en tres estratos a los siete grupos sociales.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la composición por edad y sexo de la población estudiada, y en el Tabla 2 se indican las combinaciones entre niveles educativos y ocupacionales y los respectivos grupos sociales. La Tabla 3 identifica los valores medios y de dispersión en score z de cada indicador braquial por grupo social. La figura 2 muestra los promedios del PT y el AM distribuidos según los grupos sociales.

TABLA 1
COMPOSICION POR EDAD Y SEXO DE LA
POBLACION ESTUDIADA. GENERAL LAVALLE,
BS. AS. ARGENTINA. 1994

Edad	Sexo	
	Masculino	Femenino
6	17	9
7	24	18
8	21	18
9	19	24
10	25	15
11	24	15
12	31	20
13	18	15
Total	179	134

TABLA 2
GRUPOS SOCIALES FORMADOS MEDIANTE
COMBINACION DE LOS NIVELES EDUCATIVOS
Y OCUPACIONALES. GENERAL LAVALLE, BS. AS,
ARGENTINA, 1994

Grupo Social	Nivel Educativo (a)	Nivel Ocupacional (a)
1	I	I
2	I	II
3	II	I
4	II	II
5	II	III
6	III	II
7	III	III

Test de Asociación entre niveles educativos y ocupacionales:

$$X^2 = 28.9 \text{ p} < 0.001$$

$$\text{Tau B de Kendall} = 0.23 \text{ p} < 0.001$$

(a): Ver texto

FIGURA 2
Indicadores braquiales de grasa y músculo según el grupo
social. Escolares de General Lavalle, Buenos Aires.
Argentina, 1994

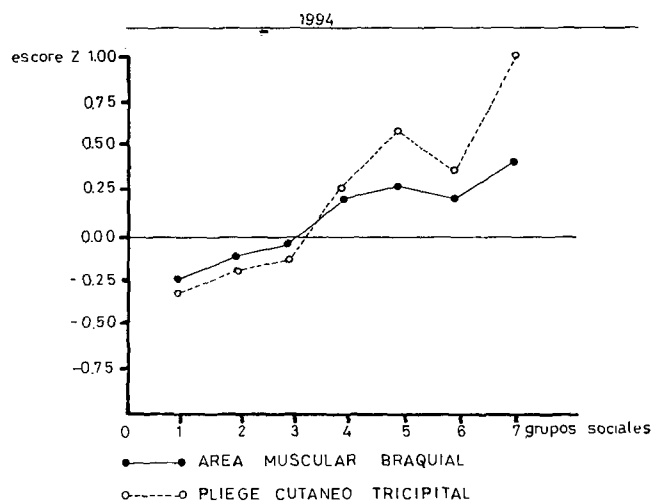


TABLA 3
MEDIA Y ERROR ESTANDAR DE PERIMETRO
BRAQUIAL, PLIEGUE CUTANEO TRICIPITAL Y
AREA MUSCULAR BRAQUIAL SEGUN EL GRUPO
SOCIAL, EXPRESADOS EN SCORE Z. GENERAL
LAVALLE, BS. AS. ARGENTINA, 1994

Grupo Social	N	PB		C		AM	
		M	ES	M	ES	M	ES
1	36	-.25	.15 (a)	-.30	.18 (a)	-.23	.09
2	41	-.27	.14 (a)	-.22	.15 (a)	-.11	.12
3	44	-.12	.12	-.15	.14	-.08	.11
4	73	.21	.10	.20	.11	.12	.08
5	19	.47	.23	.53	.26	.25	.18
6	13	.22	.35	.27	.42	.12	.27
7	12	.80	.33 (a)	.93	.34 (a)	.40	.24
		F=3.65(b)		F=3.06 (b)		F=2.26	

(a): p<0.01 según Test de Tukey (b) p<0.001

N: número de casos PB: perímetro braquial
M: media PC: pliegue cutáneo tricipital
ES: error estándar AM: área muscular braquial

Existió asociación estadísticamente significativa entre los niveles educativos y ocupacionales ($p < 0.001$). Los valores de las medidas braquiales aumentan a media que se eleva el grupo social. Sólo se halló una diferencia estadísticamente significativa entre el PB y el PT ($p < 0.001$). Un efecto particular ocurrió con los niños pertenecientes a familias del grupo social 6 que mostraron un menor valor de las medidas braquiales que el grupo social 5. Los grupos sociales 1, 2 y 3 situados por debajo de la población de referencia (Fig. 2) presentaron valores relativos de AM superiores a los del PT, inversamente de lo observado con los restantes grupos sociales, situados sobre la mediana de referencia y en los que el PT fue superior al AM. Por último los test de Tukey evidenciaron diferencias significativas al nivel de $p < 0.01$ entre los grupos sociales 1, 2 y 7. El sexo y la edad fue no significativo para $p < 0.01$.

DISCUSION

La población escolar de Gral. Lavalle, análogamente a lo reportado en otras comunidades (5,9) mostró un gradiente de los tres indicadores braquiales respecto del grupo social. De hecho en la mayoría de las poblaciones existen variaciones grupales de crecimiento, composición corporal y ritmo madurativo ligadas a factores sociales. Estas variaciones reflejan, en cierta medida, una regulación del ambiente sobre el grado de expresión fenotípica de los caracteres genéticos (25).

En la población rural estudiada se comprobaron dos patrones de composición braquial: 1) Niños cuyas familias pertenecen a los grupos sociales 1 a 3, caracterizados por promedios inferiores a los de referencia en los indicadores y AM superior al PT; y 2) Niños cuyas familias pertenecen a los grupos sociales 4 a 7, con promedios de indicadores sobre la mediana de referencia y AM inferior al PT.

Estos resultados son diferentes a los observados en comunidades urbanas de similar composición étnica, en las que el efecto ambiental se tradujo en un menor tamaño muscular con conservación o a un aumento del tejido graso subcutáneo (5,9,26). Las diferencias podrían explicarse por las peculiaridades propias de la vida en ámbitos urbanos o rurales. Los niños de áreas rurales suelen desarrollar una mayor actividad física, lo que conllevaría a mayor desarrollo muscular y mayor consumo calórico, provocando las diferencias señaladas en los componentes graso y magro. El hecho de que en los grupos de menor nivel de empleo y educación se haya observado este efecto está acorde con las características del niño que debe trabajar tempranamente para el sustento familiar. Se plantearía así una hipótesis para investigaciones futuras sobre actividad física, ambiente y composición corporal, factor no desarrollado como objetivo del presente trabajo. El efecto del grupo social 6, cuyos valores antropométricos fueron menores al 5 puede atribuirse a la mayor significación estadística del factor nivel ocupacional en relación al nivel educativo.

En síntesis la población estudiada mostró: 1. El efecto ambiental sobre el crecimiento y la composición braquial y 2.

diferencias de esta composición con respecto a poblaciones urbanas de similares características genéticas y étnicas.

REFERENCIAS

1. Roselló J.L. La relación madre hijo en el período inicial. En: Crecimiento y Desarrollo. Hechos y Tendencias. Cusminsky M., Moreno E.M., Suárez Ojeda E.N. (Eds). Washington, D.C. O.P.S. Publicación Científica 510, p. 149-158. 1988.
2. Vargas A.L. Contexto socioantropológico del crecimiento infantil. En: Crecimiento y Desarrollo. Hechos y Tendencias. Cusminsky M., Moreno E.M., Suárez Ojeda E.N. (Eds). Washington D.C., O.P.S. Publicación Científica 510, p. 20-36. 1988.
3. Lejarraga H. La supervisión del crecimiento. En: Crecimiento y Desarrollo. Hechos y tendencias. Cusminsky M., Moreno E.M., Suárez Ojeda E.N. (Eds). Washington D.C., O.P.S. Publicación Científica 510, p.507-513. 1988.
4. Tanner J.M. Foetus into man. Physical growth from conception to maturity. Cambridge, Harvard University Press, 1978.
5. Guimarey L.M., Carnese F.R., Pinotti L.V., Pucciarelli H.M. & Goicoechea. A.S. Crecimiento en escolares de Villa IAPI. Arch Lat. Nutr. 43:139-145, 1993.
6. Rona R.J. y Chinn S. National study of health and growth: social and biological factors associated with height of children from ethnic groups living in England. Ann Hum Biol, 13:453-471, 1986.
7. Smith A.M., Chinn S. & Rona J.R. Social factors and height gain of primary schoolchildren in England and Scotland. Ann Hum Biol, 2:115-124, 1980.
8. Ramos Rodríguez M.R. y Serrano Sánchez C. El proceso de homeorresis en tres grupos indígenas de México. Modificaciones en la talla y en la composición corporal. Bol Med Hosp Inf Méx., 43:599-610, 1986.
9. Pucciarelli H.M., Carnese F., Pinotti L., Guimarey L. & Goicoechea A.. Sexual dimorphism in schoolchildren of the Villa IAPI neighborhood (Quilmes, Buenos Aires, Argentina). Am J. Phys Anthropol, 92:165-172, 1993.
10. Law C.M., Barker D.J., Richardson W. W.W., Shiell A.W., Grime L.P., Armand-Smith N.G. & Cruddas A.M.. Thinness at birth in a northern industrial town. J. Epidemiol. Community Health, 47:255-259, 1993.
11. Agrelo F., Lobo B., Bazán M., Mas L., Lozada C., Jazán G. y Orellana L.. Prevalencia de delgadez y gordura excesiva en un grupo de escolares de la ciudad de Córdoba, Argentina. Arch Lat Nutr. 38:71-80, 1988.
12. Santamaría A.I. y A. Polanco. Valoración del estado nutricional. Acta Pediatr. Española, 46:349, 1988.
13. Himes J.F., Roche F. & Webb P.. Fat areas as estimates of total body fat. Am J Clin Nutr. 33:2093-2100, 1980.
14. Fanelli M.T. & Kuczmariski R.D.. Ultrasound as an approach to assessing body composition. Am J Clin Nutr, 39:703-709, 1984.
15. Hattori K., Numata N., Ikoma M., Matsuzaka A. & Danielson R.. Sex differences in the distribution of subcutaneous and internal fat. Hum Biol, 63:53-63, 1991.
16. Weststrate J.A. & Deurenberg P.. Body composition in children: proposal for a method for calculating body fat percentage from total body density or skinfold-thickness measurements. Am J Clin Nutr. 50:1104-1115, 1989.

17. Young T.K. & Sevenhuysen G.. Obesity in northern Canadian Indians: patterns determinants and consequences. *Am J Clin Nutr.* 49:786-793, 1989.
18. Frisancho A. R. & Tracer D.P. Standards of arm muscle by stature for the assessment of nutritional status of children. *Am J Phys Anthropol.* 73:459-465, 1987.
19. Kharem-Shrivastava D.K. & Puliyl J.M. Determination of bone with in malnourished children under five, and its inter relationship with arm muscle thickness, subcutaneous fat thickness and the mid upper arm girth. *Indian J Pediatr* 50:197-202, 1992.
20. Trombridge F.L., Hiner C.D. & Robertson A.D. Arm muscle indicators and creatinine excretion in children. *Am J Clin Nutr* 36:691-696, 1982.
21. Contreras de Blanco M. Indicadores de músculo y grasa en varones de los estratos socioeconómicos altos de Caracas. *Arch Latinoamer Nutr.* 38:815-833, 1988.
22. Frisancho A.R. Triceps skinfold and upper arm muscle size norms for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr.* 27:1052-1058, 1974.
23. WHO Working Group. Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. *Bull of the WHO.* 64:929-941, 1986.
24. Sociedad Argentina de Pediatría. Crecimiento y Desarrollo. Criterios de diagnóstico y tratamiento. Buenos Aires, Roemmers, 1986.
25. Penchazadeh V.D. Condicionantes básicos para el crecimiento -una larga polémica-: herencia o ambiente. En: Crecimiento y Desarrollo. Hechos y Tendencias. Cusminsky M., Moreno E.M., Suárez Ojeda E.N. (Eds). Washington D.C., O.P.S., Publicación Científica 510, p.90-101, 1988.
26. Guimarey L.M. & Bolzán A.G.. Medidas braquiales en niños menores de cinco años residentes en Villas de Emergencia. XXXI Congresso Da Sociedade Latino Americana de Investigaçao Pediátrica E. VIII Congresso Da Sociedade Latino Americana de Endocrinología Pediátrica, Itapema, Brasil, 1993.

Recibido: 03-02-1995

Aceptado: 26-09-1995

Changes of serum lipids in vitamin K₃ (menadione) treated rats

Alarcón O.M.¹, Reinoso F.A.², Silva L., T.M.¹, Padrón F., A.¹

Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

SUMMARY. The effect of high doses of vitamin K₃ (10 to 50 mg/kg/day of menadione, administered intramuscularly) on the serum content of total lipids, cholesterol, phospholipids and triglycerides in male Wistar rats was evaluated. This experimental group was compared with another group that received intramuscular injections of 10 to 50 mg/kg/day of sodium bisulphite. Hypervitaminosis K₃ was diagnosed by jaundice (due mainly to unconjugated bilirubin) and by anemia which was particularly evident at doses of 40 and 50 mg/kg/day of menadione. These doses of menadione increased serum content of total lipids, phospholipids, and triglycerides but decreased cholesterol. The results show that overdoses of vitamin K₃ alter lipid metabolism. The influence o participation of liver damage, fastening, as well as various endocrine and hematological changes are considered responsible for the alterations in serum lipids.

Keywords: menadione, hypervitaminosis K₃, serum lipids, cholesterol, triglycerides, phospholipids.

RESUMEN. Modificaciones de los lípidos séricos en ratas tratadas con vitamina K₃ (menadiona). En el presente artículo se evaluó el efecto de las dosis elevadas de vitamina K₃ (10 a 50 mg/kg/día) administradas intramuscularmente, durante 7 días, sobre los niveles séricos de lípidos totales, colesterol, fosfolípidos y triglicéridos en ratas blancas Wistar (Grupos Tratados) y se comparó con lo que sucede en ratas tratadas con dosis equivalentes de bisulfito de sodio (10 a 50 mg/kg/día) por igual lapso de tiempo (Grupos Controles). La hipervitaminosis K₃ se confirmó por la presencia de ictericia (a predominio de la bilirrubina no conjugada) y por la anemia, muy evidentes con las dosis de 40 y 50 mg/kg/día de menadiona. Estas dosis incrementaron significativamente ($p < 0.05$) el contenido sérico de lípidos totales, de fosfolípidos y de triglicéridos, pero disminuyeron el colesterol. Estos resultados demuestran que las dosis elevadas de vitamina K₃ alteran el metabolismo lipídico. El daño hepático, el ayuno y diversos cambios hematológicos y endocrinos se consideran los responsables de las alteraciones detectadas en los lípidos séricos. Palabras claves: lípidos séricos, colesterol, fosfolípidos, triglicéridos, menadiona, hipervitaminosis K₃.

INTRODUCTION

Experimental studies on hypervitaminosis K₃ are scarce. The symptoms of hypervitaminosis K₃ are not well described; in contrast, the symptoms of hypervitaminosis A and D have been extensively analyzed (1). The toxic effects of overdoses of vitamin K include: slow body growth (1), hemolytic anemia and hepatoesplenomegalia (2,3), jaundice due to unconjugated bilirubin (4), albuminuria, porfirinuria and eventual death

due to respiratory or cardiac failure (5). Previous studies have shown changes in the serum enzyme profile (6,7), as well as in tissue electrolytes in rats treated with menadione (7). Moreover, cytotoxic concentrations of menadione rapidly change intracellular thiol and Ca homeostasis (8,9). These changes are associated with alterations in the surface structure of the hepatocytes which may be an early indication of cytotoxicity (10-12). However, there are no reports on the effect of hypervitaminosis K₃ on the serum content of lipids. This article reports our findings on the effect of high doses of vitamin K₃ administered intramuscularly for seven days on the serum content of total lipids, total cholesterol, phospholipids and triglycerides in male rats.

1 Laboratorio de Bioquímica Clínica. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina.

2 Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

MATERIALS AND METHODS

Two hundred albino male Wistar rats weighing between 180 and 200 g were included in this study. They were kept in individual metabolic cages. The animals had free access to water and food during the experimental period. The formula for the basal diet was similar to the one recommended by the American Institute of Nutrition (13). After 7 days of adaptation the animals were randomly divided in 10 groups of 20 rats each. Groups one to five received equivolumetric intramuscular injections of 10, 20, 30, 40 and 50 mg/kg/day respectively of vitamin K (Sigma, menadione sodium bisulfite) for seven days (Experimental Groups). Groups six to ten received equivolumetric injections of 10, 20, 30, 40 and 50 mg/kg/day of sodium bisulfite intramuscularly for seven days (Control Groups). Sodium bisulfite was used in the control groups because menadione sodium bisulfite is dissociated into vitamin K and bisulfite in the liver of rats.

The rats were weighed and clinically checked daily. Twenty four hours after the last injection and after a fasting period of 8 hours, the rats were anesthetised with ether and a blood sample was extracted with a hematocrit tube from the orbital sinus through the external corner of the eye. The blood was allowed to coagulate spontaneously, centrifuged and serum samples were obtained to determine total lipids (14), cholesterol (15), phospholipids (16) and triglycerides (17).

Basic statistics including average and standard deviations were calculated. The differences between the blood lipid values in experimental and control groups were assessed by two Anova factor followed by Duncan's related test when granted by the Anova Test (18).

RESULTS

The animals treated with 10, 20 and 30 mg/kg/day of menadione did not show clinical symptoms except two of them that had jaundice. In contrast, all the rats treated with 40 and 50 mg/kg/day of menadione showed remarkable jaundice. The autopsy revealed that internal organs also showed jaundice. In addition, these rats had low counts of red blood cells and low hemoglobin, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin (4, 19); however, both conjugated and unconjugated bilirubin were increased (19). Table 1 shows the results of the lipid statistical analysis. Again, the animals treated with 40 and 50 mg/kg/day of menadione had increased total lipids, phospholipids and triglycerides but decreased the cholesterol level.

TABLE 1
EFFECT OF VITAMIN K₃ AND SODIUM BISULFITE
ON SERUM CONCENTRATION OF LIPIDS

COMPOUNDS	DOSES ¹	VITAMIN K ₃	BISULFITE	p ²
Total Lipids	10	266±15	273±12	NS
	20	301±13	313±13	NS
	30	317±15	316±13	NS
	40	577±14	320±13	<0.005
	50	592±13 (*)	320±16	<0.005
Triglycerides	10	52±2	62±2	NS
	20	63±3	68±6	NS
	30	131±9	69±3	<0.05
	40	150±12	71±4	<0.05
	50	195±15	72±6	<0.05
Phospholipids	10	62±4	68±6	NS
	20	74±3	68±4	NS
	30	78±7	69±6	NS
	40	99±12	74±8	<0.05
	50	150±13 (*)	79±6 (*)	<0.05
Total Cholesterol	10	92±3	72±3	<0.05
	20	63±2	74±3	<0.05
	30	57±2	76±2	<0.05
	40	54±8	71±3	<0.05
	50	45±5 (*)	78±2	<0.05

The results are expressed in mg/dL (means ± 2 S.D.)¹ Doses in mg/kg/day. ² Statistical comparison between vitamin K and bisulfite (*) Analysis of variance of means of respective groups, p<0.05 statistically significant. NS is not significant.

DISCUSSION

The term lipids applies to all fatty compounds present in the blood. The lipid compound most often quantitated in clinical chemistry are total lipids, phospholipids, total fatty acids, cholesterol (free and sterified), neutral fats, triglycerides and lipoprotein (14). Except for the cholesterol each contains some fatty acids in its molecular structure. The normal value of total lipids, phospholipids, cholesterol and triglycerides found in the control groups (sodium bisulfite treated-animals) are similar to those reported in previous studies (20,21).

Acute hypervitaminosis K₃ increased total lipids, phospholipids and triglycerides but decreased cholesterol, particularly at the doses of 40 and 50 mg/kg/day. With these doses of menadione there is an important change in certain lipids that we do not determine in this study, among which are the lipoprotein fractions, total and free fatty acids, lecithine and other fatty material present in minor quantities (14) that could

be affected by the vitamin and which will be object of further studies. The decrease of total lipids and phospholipids in the group receiving 10 to 30 mg/kg/day of menadione are not considered significant since the values found are within the range of those reported normal for rats (20,21). The effect of high doses of menadione on the serum lipids could be a consequence of a direct action of vitamin K on the synthesis of these compounds. Eskelson et al (22) found that vitamin K₃ at 10⁻⁴ M inhibits cholesterol synthesis in vitro.

The changes in serum lipids here detected could be clarified, partially at least, by the liver damage (7,10-12) produced by high doses of vitamin K₃. It is well known that serum cholesterol decrease in severe liver damage (23,24), whereas triglycerides and phospholipids increase in the case of swelling or inflammatory processes of liver (25). The level of total serum cholesterol also falls rather consistently in severe forms of anemia, specially in hemolytic anemia (23-25). Previous studies conducted in our Department (19) have shown that hypervitaminosis K₃ is responsible for severe hemolytic anemia.

Alternatively the changes in lipids might be indirectly caused by two mechanisms: 1) Hypoxia, due to low hemoglobin and to hemolytic anemia (19). Hypoxia constitutes a stimulus for fatty acids mobilization from their storage (26) overwhelming the oxidative capacity of the liver. This oversaturation would divert these lipids toward alternate routes such as resynthesis of hepatic lipids, increased synthesis of triglycerides and phospholipids as well. These compounds might pass to the blood. Hypoxia is also a powerful stimulus for the secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (27) which in turn stimulates the adrenal glands to release glucocorticoids. The glucocorticoids increase blood lipids due to their lipolytic action (28). In addition, Feketé and co-worker (29,30) demonstrated in vitro in the rat that coadministration of menadione and corticoids, such as prednisolone or cortisol, yielded an increase in the activities of these glucocorticoids. The in vivo transformation of cortisol into physiologically inactive derivatives is thought to involve ring A reduction as the rate limiting step (28). The findings of Kupfer and Peets (31) have demonstrated that menadione inhibits the ring A reduction. This mechanism involves an interference at the cofactor level. Such an action by menadione could potentiate the cortisol activity in vivo. 2) The high doses of vitamin K₃ decrease the appetite and cause a fasting state. In such situation insulin release decreases and glucagon secretion increases (32). These two endocrine phenomena lead to lipolysis (32). Moreover, fasting increases sympathetic activity (33), a powerful lipolytic mechanism (34). According to Chiodi and Bass(35) the increase of triglycerides observed in hypoxia and fasting situations could be explained by: a) abnormal release of triglycerides from the liver which surpasses the uptake capacity of the adipose tissue and b) decrease of the storage capacity of the adipose tissue. Menadione might also changes the activity of lipoprotein lipase, the main catabolic

enzyme of the circulating triglycerides(36).

The phospholipid increment seems to be due, at least partially, to the changes of activity of alkaline and acid phosphatases already described in experimental acute overdose of vitamin K₃ (2,6).

In conclusion, the present study shows that high doses of vitamin K₃ changes the level of blood lipids. Therefore, the hypervitaminosis K₃ produces serious cellular metabolic changes.

Although this work is basically experimental, and does not admit or allow extrapolation to humans, we consider the statements of Smith and Custer (37) quite appropriate regarding the toxicity of vitamin K «Among the more patent abuse in present-day therapy is the indiscriminate administration of vitamin K and its analogues. Free use of these substances is made on the assumption that they are harmless, and the physician generally believes that he is doing something of real value for his patient by giving him vitamin K during a hemorrhagic episode, be it bleeding from a tonsillar fossa, a prostatic bed or a duodenal ulcer. Rarely is such hemorrhage due to a defective coagulation mechanism, and the drug is generally given without prior evaluation of the prothrombin activity of the patients' blood.

In the face of predetermined hypoprothrombinemia, it is likewise common practice to give vitamin K in greater than adequate doses and to continue the treatment well beyond the time required to correct a true deficiency. Hypoprothrombinemia due to a seriously diseased liver cannot be corrected by vitamin K therapy, and many patients with this disorder may actually be harmed by frantic administration of menadiol sodium diphosphate, phytonadione or menadione, the only benefit being realized by the manufacturer...»

One should not be very censorious of physicians using vitamin K, however. The medical literature is virtually devoid of data relating to toxic effects of vitamin K. The textbooks of pharmacology that one consults made mention of the possibility of such effects, limited to the comment that hypoprothrombinemia, kernicterus and hemolytic anemia could be induced by giving excessive amounts of the vitamin K (37).

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the CDCHT of the Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

REFERENCES

1. Deuel M.J.: The Lipids. Their chemistry and biochemistry. Vol. III. Biochemistry, Biosynthesis, Oxidation, Metabolism and Nutritional Value. Interscience. New York. p.p.857-865. 1957.
2. Carrillo de Quintero G.. Alteraciones de la química sanguínea en ratas intoxicadas con vitamina K₃ (menadiona). Trabajo de

- ascenso a Profesor Asistente. Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica. Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela 1986.
3. Beamish R.R., Storrie V.M. Severe haemolytic reaction following intravenous administration of emulsified vitamin K₁ (Mephyton). *Can. Med. Ass J.*, 74:149-152. 1956.
 4. Vásquez R.F., Acosta P.A. Alteraciones hematológicas en la hipervitaminosis K₃ aguda experimental en ratas. Trabajo de ascenso a Profesor Agregado. Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud. Valencia. Venezuela 1981.
 5. Ansbacher S.E., Corwin W.C., Thomas B.G.H. Toxicity of menadione, menadiol and esters. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 75:111-120, 1942.
 6. Carnevalí de Tatá, E. Alteraciones hepáticas en la Hipervitaminosis K₃ aguda valoradas mediante el estudio del mapa enzimático sérico. Trabajo de ascenso a Profesor Asistente. Facultad de Farmacia. Escuela de Bioanálisis. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad e Los Andes, Mérida, 1981.
 7. Alarcón O.M., Rodríguez de Castro E., Burguera J.L., Burguera M. Efecto de la vitamina K₃ (menadiona) sobre el contenido hepático de electrolitos. *Acta Cient. Ven.* 36:232-235, 1985.
 8. Thor H., Smith T.M., Hartzell P., Bellomo G., Jewell S.A., Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem* 257:12419-12425, 1982.
 9. Di Monte D., Bellomo G., Thor H., Nicotera P., Orrenius S. Menadione - induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* 235:343-350, 1984.
 10. Malorni W., Paradisi S., Iosi F., Santini M.T. Two different pathways for necrotic cell death induced by free radicals. *Cell Biol. Toxicol.* 9:119-130, 1993.
 11. Ganey P.E., Takei Y., Kauffman F.C., Thurman R.G. Ethanol potentiates oxygen uptake and toxicity due to menadione bisulfite in perfused rat liver. *Mol Pharmacol.* 38:959-964, 1990.
 12. Sun Y.P., Cotgreave I.A., Lindeke B., Moldeus P. The protective effect of sulfite on menadione- and diquat- induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Pharmacol. Toxicol* 66:393-398, 1990.
 13. American Institute of Nutrition. Report of the AIN Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies *J.Nutr.* 107:1340-1348, 1977.
 14. Aiquel F. Manual de Análisis Clínicos. 4a. Edición Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires pp. 154-155. 1977.
 15. Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 2): 470-475, 1974.
 16. Bucolo G., David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzyme. *Clin Chem.* 19:476-482, 1973.
 17. O'Brien D., Ibbott F.A., Rodgeron D.D. Determination of plasma inorganic phosphorus, tubular reabsorption of phosphorus, and lipid phosphorus. In: *Laboratory Manual of Pediatric Microbiochemical Techniques*. 4th Edition. Harper & Row Publishers. New York pp.252-256. 1968.
 18. Doménech J.M. Bioestadística. Métodos Estadísticos para Investigadores. Editorial Herder. Barcelona. pp. 455-505, 1977.
 19. Alarcón O.M., Vásquez R.F., Acosta A., Burguera J.L., Burguera M., Ortega L., S.Y. Alteraciones hematológicas en ratas tratadas con dosis elevadas de vitamina K₃ (menadiona). *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 41:363-374, 1991.
 20. Altman P.L., Dittmer D.S. Blood and other body fluids. *Biological Handbook*. Federations of Amer. Soc. Exp. Biol. Washington, D.C. p.p. 36-40. 1961.
 21. Spector W.S. Handbook of biological data. W.B. Saunders Co. Philadelphia and London. pp.52-53. 1956.
 22. Eskelson C.D., Jacobi H.P., Casee C.R. Some effects of the fat-soluble vitamins on «in vitro» cholesterolgenesis. *Physical Chem Phys*, 2:135-149, 1970.
 23. Wallach J. Interpretations of diagnostic tests 3rd. De. Little, Brown and Co. Inc. p.43. 1978.
 24. Tietz N.W. Guía Clínica de las Pruebas de Laboratorio. De. Médica Panamericana. Buenos Aires, pp. 128, 390, 492. 1985.
 25. Eastham R.D. Biochemical values in clinical medicine. 6th Edition. Year Book of Medical Publishers Inc. Chicago, pp. 178-179, 1978.
 26. McElroy W.T. Jr., Spitzer J.J. Hypoxia as a stimulus for free acid mobilization in dogs. *J. Appl. Physiol*, 16:760-765, 1961.
 27. Marks B.H., Bhattachary A.N., Vernikos-Daniellis J. Effect of hypoxia on secretion of ACTH in the rat. *Am J. Physiol.* 208:1021-1025, 1965.
 28. Martin W.D., Rodwell, V.M. Mayer P.A. Bioquímica de Harper. 8ava. Edición. Editorial El Manual Moderno, México, pp.370-380, 1982.
 29. Fekete G., Wix G., Domok I. Enhancement of the effect of prednisolone by 2-methyl 1,4-naphthoquinone. *Nature* 197:291, 1963.
 30. Feketé G., Wix G., Domok I., Gorog P. 2nd Hungarian Conference on Therapy and Pharmacological Research. Budapest p.339. 1964.
 31. Kupfer D., Pects L. Inhibition of cortisol metabolism in vitro by 2-methylnaphthoquinone (Menadione). A possible interpretation of cortisol activity in vivo. *Experientia* 24:893-894, 1968.
 32. Foá P.P. Glucagon. An incomplete and biased review with selected references. *Am Zool*, 13:613-621, 1973.
 33. Goodner C.J., Tustison W.A., Davidson M.B., Chu Ping-Chi, Conway M.J. Studies of substrate regulation in fasting I. Evidence for central regulation of lipolysis by the sympathetic nervous system. *Diabetes* 16:576-589, 1967.
 34. Havel R.J., Goldfrien A. The role of the sympathetic nervous system in the metabolism of free fatty acid. *J. Lipid Res.*, 1:102-108, 1959.
 35. Chiodi H.P., Bass R. Hypoxic fatty liver degeneration in suckling rats. *Fed. Proc.*, 28:1080-1084, 1969.
 36. Bagdade J.D., Porte D. Jr., Bierman E.L. Acute insulin withdrawal and the regulation of plasma triglyceride removal in diabetic subjects. *Diabetes* 17: 1270132, 1968.
 37. Smith A.M. Jr., Custer R.P. Toxicity of vitamin K. Induced hypoprothrombinemia and altered liver function. *JAMA* 173:502-504, 1960.

Recibido: 29-09-1994

Aceptado: 27-10-1995

Influencia de la ingesta de aceites vegetales en la absorción intestinal de glucosa in vitro en hamster dorado¹

Iris González Barra², Marcela Escobar³ y Mauricio Villarroel Guerra⁴

Facultad de Ciencias, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

RESUMEN. Para esclarecer la influencia de la ingesta de aceites vegetales con diferente grado de insaturación sobre la absorción intestinal de glucosa, se alimentaron durante cuatro semanas Hamster machos (*Mesocricetus aureatus*) con dietas estandarizadas al 15% de aceite de Rosa mosqueta, Maravilla, Oliva o Coco.

Al cabo del período de ingesta preestablecido, en cada animal se midió la concentración de glucosa alcanzada en la solución serosal de segmentos de intestino delgado evertidos, a los 20, 40 y 60 minutos. Tomando estos valores como un indicador de la absorción intestinal de glucosa, se observó una menor concentración de ella en el grupo Oliva al comparar este con los grupos restantes, pero sólo fue estadísticamente significativo en relación con los grupos Rosa mosqueta y Coco ($p < 0.05$).

El comportamiento similar observado en los grupos alimentados con Rosa mosqueta y Coco, aceites con valores extremos y opuestos de insaturación, podríamos atribuirlo al desencadenamiento de mecanismos homeostáticos en la membrana celular de los enterocitos frente al estrés nutricional ocasionado por los ácidos grasos saturados e insaturados de dichos aceites.

Podemos concluir que la absorción intestinal de glucosa in vitro en Hamster dorado se ve afectada por los lípidos de la dieta. La menor absorción de glucosa observada en el grupo Oliva podría ser el resultado de la acción específica de un ácido graso en particular o de su grado de insaturación.

SUMMARY. Influence of intake of vegetable oils on the in vitro intestinal absorption of glucose in golden hamster. Male Hamsters (*Mesocricetus aureatus*) were fed standardized diets with 15% Rose hip, Sunflower, Olive or Coconut oil for four weeks, in order to determine the influence of vegetable oils with different degree of unsaturation over the intestinal absorption of glucose.

The concentration of glucose in the serosal solution at 20, 40 and 60 minutes, was quantified in pieces of everted intestine of each animal, after the feeding period was over. A lower concentration of glucose was observed in the Olive group, although it was statistically significant only when compared to the Rose hip and Coconut oil group ($P < 0.05$). The groups fed Rose hip and Coconut showed a similar pattern, even though they are oils with extreme and opposing degree of unsaturation. We explain this by the triggering of homeostatic mechanisms in the cellular membranes of the enterocytes when faced to a nutritional stress caused by the saturated and unsaturated fatty acids of those oils. We can conclude that the in vitro intestinal absorption of glucose in golden hamster is modified by dietary lipids. The lower absorption of glucose seen in the Olive group could be caused a specific action of a fatty acid or of its degree of unsaturation.

INTRODUCCION

La absorción intestinal es el proceso mediante el cual las diferentes sustancias nutritivas resultantes de la digestión ingresan al organismo. Los enterocitos, células principales de la mucosa intestinal, implicados en este proceso presentan una membrana plasmática con regiones que difieren en su composición química y fluidez (1).

Las membranas celulares de naturaleza lipoproteica cambian sus características físico-químicas cuando en su entorno se altera entre otros la temperatura o el aporte de

1 Proyecto 02/91, financiado por DIUV (Dirección de Investigaciones de la Universidad de Valparaíso).

2 Profesor Adjunto, Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Chile.

3 Profesor Auxiliar, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Chile.

4 Tesista, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Chile.

nutrientes (1,2,3). Estas modificaciones afectan el funcionamiento de las proteínas insertas en ella.

La Na⁺ K⁺ ATPasa y transportadores de glucosa, proteínas integrantes de la membrana plasmática del enterocito, involucradas en el proceso de absorción intestinal, experimentan modificaciones de su actividad si su microambiente lipídico cambia su composición química y por ende su fluidez. Entre las variables que modifican la fluidez de las membranas celulares, están el contenido de colesterol y el grado de insaturación de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos (4,5,6).

Basado en estos antecedentes y teniendo presente que los lípidos ingeridos son de diferente composición química y grado de insaturación, el proceso de absorción intestinal de glucosa puede verse afectado. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar en Hamster dorado si la ingesta de dietas isocalóricas con un 15% de aceite de Rosa mosqueta, Maravilla, Oliva o Coco, diferentes en su grado de insaturación, modifican la absorción intestinal de glucosa in vitro.

MATERIALES Y METODOS

Hamster machos (*Mesocricetus aureatus*), con un promedio de peso corporal de 72.1±5.3 g. se distribuyeron al azar en cuatro grupos, los cuales fueron alimentados durante cuatro semanas con dietas estandarizadas isocalóricas que contenían un 15% de aceite de Rosa mosqueta, Maravilla, Oliva o Coco, cuya formulación se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1
COMPOSICION QUIMICA DE LAS DIETAS
ESTANDARIZADAS

Compuestos	g/100g.
Caseína	20.0
DL-Metionina	0.3
Mezcla mineral	4.0
Mezcla vitamínica	1.0
Chuíño	5.0
Maicena	20.0
Sacarosa	34.7
Aceite (*)	15.0

(*) Aceite de Rosa mosqueta, Maravilla, Oliva o Coco.

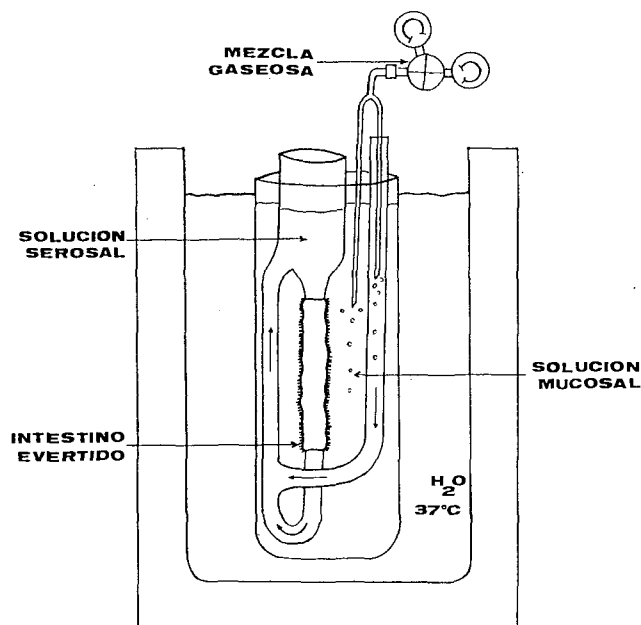
Estos animales se mantuvieron en jaulas individuales debidamente rotuladas, sometidos a ciclos alternados de 12 hrs. de luz y oscuridad, alimentados sin restricción, con temperatura y humedad controlada.

La ingesta fue controlada día por medio y el peso corporal semanalmente.

Al cabo de las cuatro semanas de tratamiento dietario, los animales fueron anestesiados con tiopental sódico en dosis de

60 mg/kg de peso corporal vía intraperitoneal. A cada uno de ellos, se le extrajo un segmento de yeyuno de aproximadamente 11 cm., los cuales se lavaron con suero fisiológico 0.9% a 37 °C para eliminar su contenido. Posteriormente los intestino fueron evertidos cuidando no dañar la mucosa e instalados de acuerdo a la Figura 1.

FIGURA 1
Modelo experimental de Crane y Wilson modificado para intestino evertido in vitro con circulación de la solución serosal (8)



En el modelo experimental se utilizaron 15 mL de Ringer como solución serosal y 120 mL de Ringer glucosado al 0.6% como solución mucosal. Ambas soluciones se mantuvieron oxigenadas con una mezcla gaseosa de 95% de O₂ y 5% de CO₂ y templadas a 37° C.

La solución serosal permaneció durante todo el ensayo en constante circulación (8).

Una vez estabilizado el sistema, se extrajeron alícuotas de 20 uL de solución serosal a los 20, 40 y 60 minutos. A estas muestras se les midió las concentraciones de glucosa mediante el método enzimático colorimétrico Merckotest 14365 Glucosa GOD-PAP.

Las variaciones de concentración de glucosa en la solución serosal obtenidas en los intervalos de tiempo preestablecidos se consideraron como indicadores de la absorción intestinal de glucosa.

Mediante la obtención de los ésteres metílicos de cada uno de los aceites empleados y la correspondiente cromatografía gaseosa, se obtuvieron los perfiles de ácidos grasos de estos lípidos, cuyos valores porcentuales se agrupan en la Tabla 2.

TABLE 2
COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS
ACEITES DE LAS DIETAS ESTANDARIZADAS
(% DE ESTERES METILICOS)

Acidos grasos	Aceites			
	R. mosqueta	Maravilla	Oliva	Coco
Ac. Caproico				3.16
Ac. Caprílico				3.66
Ac. Cáprico				4.63
Ac. Láurico				45.48
Ac. Mirístico	0.04			18.87
Ac. Palmítico	4.06	5.56	12.44	9.89
Ac. Esteárico				3.32
Total Saturados	4.10	5.56	12.44	88.81
Ac. Palmitoléico			1.58	
Ac. Oléico	23.60	36.05	69.81	8.50
Ac. Erúcido		2.95		
Total Monoinsaturados	23.60	39.00	71.39	8.50
Ac. Linoléico	40.61	49.06	13.85	2.70
Ac. Linolénico	31.67	2.30	1.67	
Total Polinsaturados	72.28	51.36	15.52	2.70
Relación Saturados: Monoinsaturados : Poliinsaturados				
Rosa mosqueta		1:	5.8:	17.60
Maravilla		1:	7.0:	9.20
Oliva		1:	5.7:	1.20
Coco		1:	0.1:	0.03
Indice de Poliinsaturados (Total AGPI / AGS)				
Rosa mosqueta				17.60
Maravilla				9.20
Oliva				1.20
Coco				0.03

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente empleando la prueba t de Student para muestras no pareadas en busca de diferencias significativas con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

A pesar que los lípidos integrantes de las cuatro dietas tenían características sensoriales, composición química y ori-

gen diferente, los hamster no mostraron preferencia por alguna en particular ya que los valores de ingesta total y diaria obtenidos en cada grupo no presentan diferencias estadísticamente significativas, valores que se muestran en la Tabla 3.

TABLE 3
INGESTA TOTAL* Y DIARIA* EN HAMSTER
DORADO ALIMENTADOS CON DIETAS AL 15%
DE ACEITE DURANTE 4 SEMANAS

Dietas	n	Ingesta total (g)	Ingesta diaria (g/día)
R. mosqueta	7	302.3 ± 48.3	11.0 ± 1.6
Maravilla	6	287.0 ± 35.6	10.3 ± 1.3
Oliva	8	291.9 ± 33.1	10.7 ± 1.1
Coco	7	326.7 ± 49.5	11.8 ± 1.6

* Promedio ± desviación estándar.

Partiendo de un promedio de peso corporal estadísticamente similar para los cuatro grupos de animales, la ganancia de peso alcanzada por ellos, durante cada semana hasta el final del tratamiento dietario, no resultó estadísticamente significativa, lo cual podríamos atribuirlo a que el aporte calórico de las dietas era el mismo (455 Kcal/100 g.). El incremento ponderal calculado en cada grupo ratifica los resultados obtenidos (Tabla 4).

TABLE 4
PESOS CORPORALES SEMANALES*
E INCREMENTO PONDERAL* EN HAMSTER
DORADO ALIMENTADOS CON DIETAS AL 15%
DE ACEITE DURANTE 4 SEMANAS (g.)

	Dietas estandarizadas			
	R. Mosqueta (9)	Maravilla (9)	Oliva (8)	Coco (7)
Peso inicial	72.3 ± 5.5	71.8 ± 6.2	70.3 ± 6.3	74.2 ± 2.1
I Semana	86.6 ± 5.5	86.7 ± 7.2	87.6 ± 6.9	87.5 ± 4.5
II Semana	104.5 ± 8.5	106.0 ± 9.0	106.6 ± 12.8	105.7 ± 5.2
III Semana	116.5 ± 12.0	119.6 ± 10.9	120.2 ± 15.6	119.2 ± 6.1
IV Semana	126.8 ± 12.3	131.7 ± 11.1	131.7 ± 18.8	131.2 ± 9.0
Incremento Ponderal	54.5 ± 12.6	59.8 ± 13.5	61.3 ± 18.2	57.0 ± 8.5

* Promedios ± desviación estándar.

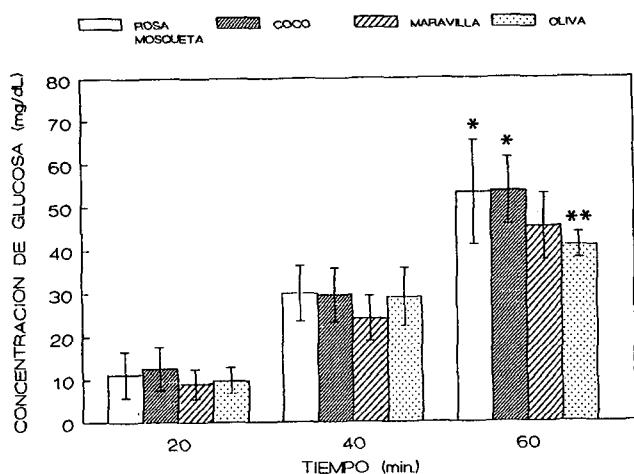
Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales por grupo.

En trabajos previos realizados con ratas de las especies Wistar y Sprague Dawley no se encontraron variaciones en la ingesta ni en la ganancia de peso, cuando se alimentaron con aceite de Maíz o Rosa mosqueta incorporados a la dieta en un 15% ó 20% (9,10).

La concentración de glucosa de la solución serosal considerada como indicador de la absorción intestinal fue estadísticamente similar en los grupos Rosa mosqueta, Maravilla y Coco a los 20, 40 y 60 minutos, aún cuando el grupo alimentado con aceite de Maravilla mostró valores inferiores (Figura 2).

FIGURA 2

Glucosa en solución serosal de intestinos evertidos en Hamster alimentados con dietas al 15% de aceite



Cada barra representa valores promedios y las desviaciones estandares respectivas.

Análisis estadístico: t Student para muestras no pareadas
 $p < 0.05$: * vs **

Respecto al grupo alimentado con aceite de Oliva, la concentración de glucosa de la solución serosal fue menor a los 60 minutos en relación con los tres grupos restantes, pero sólo estadísticamente diferente al comparársele con los grupos alimentados con Rosa mosqueta y Coco ($p < 0.05$).

La absorción intestinal in vitro de glucosa en ratas se ve afectada por la composición en ácidos grasos dietarios. Estos cambios no están asociados con variaciones en el consumo de alimentos, ni con variaciones en el peso corporal; tampoco se asocian con cambios en el contenido de colesterol o fosfolípidos del ribete en cepillo. Las diferencias encontradas pueden deberse a cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas, los cuales varían de acuerdo a las manipulaciones dietarias (7,11,12,13).

En nuestro laboratorio, investigaciones realizadas en ratas, orientadas a comparar el efecto de la ingesta de aceite de Maravilla (rico en ácidos grasos poliinsaturados, AGPI) u Oliva (rico en ácidos grasos monoinsaturados, AGMI) se observó una mayor absorción intestinal de glucosa in vitro en

el primer grupo (14). Resultados similares fueron observados en trabajos realizados por Thomson y col., los cuales utilizaron como fuente de AGPI el aceite de Linaza y Azafrán y de AGMI el aceite de Oliva. Por otra parte al comparar el efecto de dietas ricas en AGPI con dietas ricas en ácidos grasos saturados (AGS) obtuvieron valores inferiores en el grupo de ratas alimentadas con grasas saturadas (7,11,12).

Nuestros resultados en Hamster muestran que la absorción intestinal de glucosa en el grupo alimentado con una dieta que contenía AGPI (72.28%), como es el aceite de Rosa mosqueta, fue similar en los intervalos de tiempo medidos a la de los animales alimentados con aceite de Coco, rico en AGS (88.81%). Estos resultados no concuerdan con los observados por Thomson en ratas, quien a diferencia de nosotros utilizó grasas saturadas de origen animal.

Se ha señalado que los ácidos grasos más insaturados predominantes dentro de las membranas celulares se localizan alrededor de las moléculas de proteínas (enzimas y transportadores) modulando su actividad biológica (15,16). La razón AGPI/AGS puede verse alterada por un predominio de ácidos grasos saturados debido a un estrés nutricional continuo, lo cual generaría una disminución de la fluidez y de la actividad de las proteínas insertas en la membrana (2,4,17,18). Este brusco cambio de la composición química de la membrana desencadenaría una respuesta homeostática de mayor significancia que el aumento en el contenido de ácidos grasos saturados provocados por la dieta con aceite de Coco, la que aumentaría la fluidez y la actividad de las proteínas de membrana; este mecanismo denominado «Adaptación Homeoviscosa» es una respuesta dada por modificaciones de la bicapa lipídica, que generalmente incluye cambios en el grado de insaturación de las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana y/o cambios en su contenido de colesterol (1,18,19). Esto nos permitiría explicar en alguna forma el comportamiento del aceite de Coco utilizado en nuestra investigación.

En relación a los resultados obtenidos con aceite de Rosa mosqueta y Maravilla, si bien es cierto la diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa, no por ello estos valores pueden considerarse despreciables; el aumento de la absorción intestinal de glucosa en el grupo alimentado con aceite de Rosa mosqueta en comparación con el grupo alimentado con aceite de Maravilla, se debería al mayor porcentaje de AGPI del primer aceite, el cual aumentaría la fluidez de la membrana del enterocito y la actividad de la $Na^+ K^+$ ATPasa, generándose un mayor gradiente de sodio entre el exterior y el interior del enterocito y secundariamente un incremento de la actividad de los transportadores de glucosa Na^+ -dependiente y Na^+ -independiente (2,3,4,18,20,21,22).

De los cuatro grupos de animales utilizados en nuestro ensayo, la menor absorción de glucosa observada a los 60 minutos, se registró en el grupo alimentado con aceite de Oliva. Este aceite se caracteriza por su alto contenido en ácido oléico (69.81%).

Se ha descrito al ácido oléico como inhibidor de las enzimas $H^+ K^+$ ATPasa de la mucosa gástrica de cerdo y de la $Na^+ K^+$ ATPasa de riñón de perro, alterándose con ello el funcionamiento de estos tejidos (23). De acuerdo a estos antecedentes, en los hamster alimentados con aceite de Oliva, las proteínas de membrana relacionadas con el proceso de absorción intestinal de glucosa ($Na^+ K^+$ ATPasa y transportadores de glucosa) se verían afectadas por la presencia de ácido oléico en dichas estructuras.

Según nuestros resultados, podemos concluir que en Hamsters dorados alimentados durante cuatro semanas con dietas isocalóricas con un 15% de aceite de Rosa mosqueta, Maravilla, Oliva o Coco, el proceso de absorción intestinal de glucosa se ve afectado por la composición química de los lípidos dietarios. Este proceso al parecer no se modifica cuando el índice de poliinsaturación de los aceites tiene valores extremos y puestos, como es el de Rosa mosqueta y Coco.

REFERENCIAS

1. Brasitus, T.A., Davidson N.O. & Schachter D. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim Biophys. Acta* 812:460-472, 1985.
2. Goldman, S.S. Cold resistance of the brain during hibernation III. Evidence of a lipid adaptation. *Am J Physiol.* 228(3): 834-838, 1975.
3. Dudeja, P.K., Wali R.K., Haring J.M. & Brasitus T.A. Characterization and modulation of rat small intestinal brush-border membrane transbilayer fluidity. *Am J Physiol.* 260:G586-G594, 1991.
4. Murphy M.G. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J Nutr Biochem.* 1:68-79, 1990.
5. Vajreswari A. & Narayanareddy F. Effect of dietary fats on erythrocyte membrane lipid composition and membrane-bound enzyme activities. *Metabolism* 41(4):352-358, 1992.
6. Yeagle, P.L. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB. J.* 3:1833-1842, 1989.
7. Thomson A.B.R., Keelan M., Garg M.L. & Clandinin M.T. Influence of dietary fat composition on intestinal absorption in the rat. *Lipids* 24:494-501, 1989.
8. Marano C.G., Reinoso M.I. & Lufrano P. Absorción de fármacos. Modelos in vitro e in situ. *Acta Farm. Bonaerense.* 10(1):37-48, 1991.
9. González I., Celedón G., Montalar Y. & Lutz M. Dietary rose hip and corn oils effects on biliary and plasma lipid patterns, and hepatocyte membranes fluidity in rats. *Nutr Rep Int.* 40(2):271-279, 1989.
10. Lutz M., Torres M., Carreño P. & González I. Comparative effects of rose hip and corn oils on biliary and plasma lipids in rats. *Arch Latinoamer Nutr.* 43(1): 23-27, 1993.
11. Thomson A.B.R., Keelan M., Clandinin M.T. & Walker K. Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. *J Clin Invest.* 77:279-288, 1986.
12. Thomson A.B.R., Keelan M., Garg M. & Clandinin M.T. Spectrum of effects of dietary long-chain fatty acids on rat intestinal glucose and lipid uptake. *Can J Physiol. Pharmacol.* 65:2459-2465, 1987.
13. Thomson, A.B.R., Keelan, M., Clandinin, M.T., Rajotte, R.V., Cheeseman, C.I. & Walker, K. Treatment of the enhanced intestinal uptake of glucose in diabetic rats with a polyunsaturated fatty acid diet. *Biochim Biophys. Acta* 905:426-434, 1987.
14. Donoso S. & Lagos A. Efecto de los aceites vegetales maravilla y oliva sobre la absorción intestinal in vitro de glucosa en ratas. Seminario de Fisiopatología. Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso, 1991.
15. De Robertis E.D. & De Robertis E.M. *Biología celular y molecular.* 11^a. ed. B. Aires, Ed. El Ateneo, p. 640. 1988.
16. Lutz M. Roles de los lípidos en la estructura de membranas biológicas. *Rev Chil Nutr* 18(3): 235-238, 1990.
17. Carruthers A. & Melchior D.L. Effects of lipid environment on membrane transport: The human erythrocyte sugar transport protein/lipid bilayer system. *Ann Rev Physiol.* 50:257-271, 1988.
18. Shinitzky, M. *Physiology of membrane fluidity.* Boca Raton Florida: CRC Press, Inc., 1 y 2:1-16, 1984.
19. Heemskerck J.W.M., Feijge M.A.H., Kalafusz R. & Hornstra G. Influence of dietary fatty acids on membrane fluidity and activation of rat platelet. *Biochim Biophys. Acta* 1004:252-260, 1989.
20. Lienhard G.E., Slot J.W., James D.E. & Mueckler M.M. Absorción celular de la glucosa. *Investigación y Ciencia.* Marzo: 22-28, 1992.
21. Takata, K., Kasahara T., Kasahara M., Ezaki O. & Hirano H. Immunohistochemical localization of Na^+ -dependent glucose transporter in rat jejunum. *Cell Tissue Res.* 267: 3-9, 1992.
22. Ferraris, R.P. & Diamond, J.M. Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Ann Rev Physiol.* 51: 125-141, 19.
23. Murakami, S., Muramatsu, M. & Otomo, S. Oleic acid as an inhibitor of gastric H^+ , K^+ -ATPase. *Res Comm Chem Path and Pharm.* 71(3): 337-350, 1991.

Recibido: 03-02-1995.

Aceptado: 13-10-1995.

Polyunsaturated fatty acid deficiencies: effects on hepatic plasma membrane fatty acid composition and enzyme activity

Ofelia Angulo G.

Instituto Tecnológico de Veracruz, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Veracruz, México

SUMMARY. Research on dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA), on the activity of 5' nucleotidase and adenylate cyclase are largely contradictory due, mostly, to the absence of adequate control group. In this study, four different diets have been evaluated on the 5' nucleotidase and adenylate cyclase activities in rat liver plasma membranes. Wistar rats were given a semisynthetic diet in which lipids were supplied by 5% of either peanut oil (n-3 PUFA deficient diet), cod liver oil (n-6 PUFA deficient diet) partially hydrogenated palm oil (total PUFA deficient diet) and a mixture of peanut and rapeseed oil (control group). Liver plasma membranes were separated by using a Percoll gradient in a Beckman JA 20 centrifuge. 5' nucleotidase and adenylate cyclase activities were measured in a liquid scintillation detector by following the degradation of $^3\text{HAMP}$ (adenosine monophosphate) and production of $^3\text{HcAMP}$ (cyclic adenosine monophosphate) respectively. Animals fed the total PUFA deficient diet exhibited significant lower body weight and lower liver weight than did the control group. Low cholesterol concentrations were observed in animals deficient either in n-3 or total PUFA in relation to the control group. All dietary deficiencies studies provoked reduced phospholipid levels. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were not modified whatever the deficiency studied. Phospholipids fatty acid composition was significantly modified by the diets studied. The specific activity of 5' nucleotidase in hepatic plasma membrane was independent of dietary PUFA. The catalytic unit of adenylate cyclase complex in totally deficient animals was augmented. The unit of the enzyme stimulated by the guanydyl imidodiphosphate (GppNHp) in n-3 PUFA deficient animals was augmented and reduced in animals receiving the n-6 PUFA deficient diet. In conclusion, our results show that each dietary PUFA deficiency modifies differently the proportions of phospholipid classes and their fatty acid composition. The mechanisms responsible for these modification remain to be elucidated. However, the phospholipid fatty acid changes did not influence the 5' nucleotidase activity except in the case of extreme excess which concerns more toxicology than nutritional modifications. Finally, the catalytic unit (Forskoline+GDPβs) of adenylate cyclase complex and the regulatory unit (GppNHp) may be sensitive to alterations in PUFA composition.

RESUMEN. Deficiencias de ácidos grasos poliinsaturados: Efectos sobre la composición lipídica y actividades enzimáticas hepáticas. Los resultados de los trabajos realizados sobre los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) dietarios en las actividades de la 5' nucleotidasa y adenilato ciclasa son contradictorios debido principalmente a las diferentes dietas usadas como testigo. En este trabajo se evaluaron 4 dietas diferentes sobre la actividad de la 5' nucleotidasa y de la adenilato ciclasa de la membrana plasmática hepática de rata. Ratas Wistar recibieron una dieta semisintética con 5% de aceite de cacahuete (Dieta deficiente en AGPI n-3), aceite de hígado de bacalao (Dieta deficiente en AGPI n-6), aceite de palma parcialmente hidrogenada (Dieta totalmente deficiente en AGPI) y una mezcla de aceite de cacahuete y colza (Dieta testigo). La membrana plasmática se obtuvo por centrifugación con gradiente de Percoll. Las actividades de la 5' nucleotidasa y adenilato ciclasa se midieron por centelleo líquido siguiendo la degradación de $^3\text{HAMP}$ (adenosina monofosfato) y producción de $^3\text{HAMPc}$ (adenosina monofosfato cíclico). Los resultados muestran que los animales alimentados con la dieta deficiente en AGPI totales presentaron pesos corporales y peso de hígado menores que los animales testigo. Se observaron niveles de colesterol menores en los animales deficientes en AGPI n-3 y en AGPI totales. Todos los tratamientos dietarios redujeron los niveles de fosfolípidos. La dieta no modificó las proporciones de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. La composición lipídica de los fosfolípidos fue drásticamente modificada por las diferentes deficiencias dietarias en AGPI. La actividad específica de la 5' nucleotidasa de la membrana plasmática hepática no se modificó por las diferentes deficiencias dietarias estudiadas. Sin embargo, la actividad catalítica (Forskolina+GDPβs) del complejo adenilato ciclasa aumentó en los animales totalmente deficientes en AGPI. La unidad de la enzima catalizada por el GppNHp en los animales que recibieron la dieta deficiente en AGPI n-3 aumentó y disminuyó en los animales deficientes en AGPI n-6. En conclusión, estos resultados muestran que las deficiencias dietarias en AGPI modifican en forma diferente las proporciones de las clases de fosfolípidos y su composición lipídica. Los mecanismos responsables de estas modificaciones no han sido elucidados. Sin embargo, los cambios en la composición en ácidos grasos no modificó la actividad de la 5' nucleotidasa. Finalmente, la unidad catalítica (Forskolina+GDPβs) y la unidad reguladora (GppNHp) del complejo adenilato ciclasa pueden ser sensibles a las alteraciones en la composición de AGPI.

INTRODUCTION

Plasma membrane proteins (enzymes, receptors, and ionic channels) are directly related to the membrane lipid bilayer. Examples of these are the 5' nucleotidase, adenylate cyclase and Na-K-ATPase. The 5' nucleotidase catalyzes the dephosphorylation of adenosine 5' monophosphate (5'AMP). Adenylate cyclase is directly related to the cellular communication and as such plays a fundamental role in regulating cellular metabolism via the cyclic adenosine monophosphate (cAMP).

Research on dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the activity of 5' nucleotidase and adenylate cyclase from hepatic plasma membrane began in 1970(1). Total dietary PUFA deficiency in the rat reduced the activities of 5' nucleotidase and adenylate cyclase activities from hepatic plasma membrane (2,3). However, the studies regarding the dietary n-3 and n-6 PUFA deficiencies are largely contradictory. Some authors observed increased activity of 5' nucleotidase in hepatic plasma membrane (4), cardiac sarcolemma (5) and intestinal brush border membrane (6) whereas Zuniga and Kinsella (7) and Baracca et al (8) showed no effect on this activity by a diet rich in PUFA. Morson and Clandinin (9) reported no relationship between n-6 dietary PUFA and adenylate cyclase activity. However, for Lee and Ham (10) the adenylate cyclase activity is directly related to dietary n-6 PUFA. For some groups, when dietary n-3 PUFA increase, 5' nucleotidase and adenylate cyclase activities in liver and heart plasma membrane increase as well (11, 12, 13). Although there is a vast volume of literature associated with the biological significance of polyunsaturated fatty acids, the results of these research work are largely contradictory due mostly to the absence of similarities in the control group. This factor was taken into account in our study in which the n-6 and n-3 dietary PUFA families were analyzed independently as well as the total PUFA deficiency in relation to the control group that contains both PUFA families (n-6+n-3). Therefore, in this study, four different diets, in which PUFA type was the only modifying factor, have been evaluated on the lipid composition and the 5' nucleotidase and adenylate cyclase activities in rat liver plasma membranes.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals: Wistar rats were given a semisynthetic diet in which lipids were supplied by 5% of oil (Table 1). Two weeks before mating at 10 weeks of age, four groups were constituted. The control group was fed a purified diet in which lipid supply consisted of peanut and rapeseed oil mixture (Group 1). The n-3 PUFA deficient group was given a purified diet which contained peanut oil as lipid source (Group 2). The n-6 PUFA deficient diet was obtained by using cod liver oil as lipid source (Group 3). The total PUFA deficient group was fed a purified diet in which lipid supply consisted of partially hydrogenated palm oil (Group 4). The fatty acid composition of dietary lipids is presented in Table

2. The deficient and the control group were fed their respective diets for two generations. Only the males of the second generation were used for this experiment. After delivery females were caged individually and the litters were equalized to 10 pups each. Then animals were killed by decapitation at adult age (90 days).

TABLE 1
DIET COMPOSITION (g/Kg)

Composition %	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	Control	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
Casein	22.0	22.0	22.0	22.0
DL methionine	0.16	0.16	0.16	0.16
Cellulose	2.0	2.0	2.0	2.0
Starch	43.90	43.90	43.90	43.90
Sucrose	21.94	21.94	21.94	21.94
Vitamin mixture ^a	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture ^b	4.0	4.0	4.0	4.0
Hydrogenated palm oil	—	—	—	5.0
Peanut oil	2.5	5.0	—	—
Cod liver oil	—	—	5.0	—
Rapeseed oil	2.5	—	—	—

a Total vitamin supplement, United States Biochemical Corp. Cleveland, OH.
b Composition g/100 g: CaHPO₄ 2H₂O, 38.0; K₂HPO₄ 24.0; CaCO₃, 18.0; NaCl, 6.9; MgO, 2.0; MgSO₄ 7H₂O, 9.0; FeSO₄ 7H₂O, 0.086; ZnSO₄ H₂O, 0.5; MnSO₄ H₂O, 0.5; CuSO₄ 5H₂O, 0.1; NaF, 0.08; CrK(SO₄)₂ H₂O, 0.05; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O, 0.002; KI, 0.004; CoCO₃, 0.002; NaSeO₃ 5H₂O, 0.002.

TABLE 2
FATTY ACID COMPOSITION OF DIETARY LIPIDS

Fatty Acids %	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	Control	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
16:0	10.1	11.9	10.7	51.5
18:0	2.3	2.9	1.6	8.4
Σ Saturated	14.9	18.2	20.2	63.1
18:1 n-9	53.3	56.1	19.1	28.0
18:1 n-7	6.0	3.1	4.1	4.9
Σ Monounsaturated	61.3	61.8	53.2	35.1
18:2 n-6	19.8	19.9	2.2	1.8
Σ PUFA n-6	19.8	19.9	2.9	1.8
18:3 n-3	4.0	0.1	1.2	—
20:5 n-3	—	—	8.5	—
22:5 n-3	—	—	2.4	—
22:6 n-3	—	—	9.0	—
Σ PUFA n-3	4.0	0.1	23.7	—
Σ Total PUFA	23.8	20.0	26.6	1.8
n-6/n-3	5.0	199.0	0.1	—
Fatty acids/100 g of diet:				
n-6 PUFA (mg)	930.6	935.3	136.3	84.6
N-3 PUFA (mg)	188.0	4.7	1113.9	—

Note: Lipid fatty acid composition was analyzed by gas chromatography of fatty acid methyl esters in the following conditions: Carlo Erba Chromatograph model 4180, automated injection using flame ionization detector, silica capillary column fused with carbowax 52. control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet= peanut oil, n-6 PUFA deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil

Membrane purification: Liver plasma membranes were separated by the method of Epping and Bygrave (14). Briefly, 10 g of liver were homogenized with 15 ml of cold buffer using a Teflon Potter homogenizer (Thomas C) using 15 up and down strokes at 2,000 rpm. The homogenate was filtered through a tissue and centrifuged at 10,000 rpm (12,000 x g) for 10 minutes in a Beckman JA20 centrifuge. The supernatant, diluted to 75% with Percoll, was then placed at the bottom of the tube followed by a step Percoll gradient (30, 25, 18, 10 and 0% v/v). (Pharmacia, St. Quentin Yvelines, France) and centrifuged at 20,000 rpm (48,000 x g) for 4 minutes at 4 °C. The plasma membrane fraction was collected at the 10%-0% interface. This fraction was measured and incubated at 37 °C for 10 minutes. Then it was diluted with a Percoll solution (75%, v/v) to a ratio of 2 ml of Percoll per 5 ml of membrane fraction. Seven ml of this membrane fraction was placed again at the bottom of the tube followed by a step gradient (18%, 10%, 0% v/v) and centrifuged under the conditions mentioned above. The plasma membranes obtained were immediately used for enzyme activity measurements. Protein analysis was done by the Bradford (15) technique.

Plasma membrane lipid analysis: Total lipids from plasma membrane were extracted by the Folch et al (16) procedure in the presence of butyl hydroxytoluene (BHT) at a 0.02% (wt/v). Cholesterol was assayed enzymatically by the Wolff's method (17). Total phospholipids were determined by measuring the total phosphorus as described by Bartlett et al (18).

After total lipid extraction, phospholipid classes from plasma membranes were separated by high pressure liquid chromatography (Beckman 332 silica capillary column coated with zorbax 5 m). Transesterification of phospholipid fatty acids was achieved using BF₃-methanol (10% wt/v) reagent at 90 °C for 20 min (19). Fatty acid methyl esters (FAME) were extracted using hexane and analyzed by gas chromatography using a Carlo Erba 4180 model with automated injection, flame ionization detector and a silica capillary column fused with carbowax 52. Hydrogen was used as the carrier gas. Injection and detector temperatures were 154 °C and 250 °C respectively. The column temperature was programmed to rise from 54 °C to 220 °C at a rate of 3 °C/min. FAME peaks were identified by comparison with authentic standards (SIGMA, St. Louis, MO, U.S.A.).

Enzyme activity: 5'Nucleotidase (E.C.3.1.3.5) assay 5'nucleotidase activity of liver plasma membrane was determined by measuring the degradation of ³HAMP (adenosine monophosphate) in a liquid scintillation detector (Packard model TRI-CARB 1500) (20). The assay was carried at 37 °C during 60 min. in an incubation mixture containing Tris/HCl 50 mM, MgCl₂ 180 mM, AMP(Na) 254 mM and (³H) AMP 15 Ci/nmole, with 500 ng of protein. The enzyme activity was calculated taking into account the isotope specific

activity (33x10⁶ dpm corresponding to 1 nmole of (³H)AMP hydrolyzed).

Adenylate Cyclase (E.C. 4.6.1.1.) assay : Adenylate cyclase activity of liver plasma membrane was determined according to Salesse R. (21) by measurement of labeled cyclic (³H) AMP generated from the substrate ATP in the presence of μg protein. The reaction was carried out at 37 °C during 20 min. The incubation mixture contained creatine phosphate (100 mM), creatine phosphokinase (375 U/ml), myokinase (850 μg/ml), ATP 0.1M, adenosine deaminase (1000 U/ml), isobutylmethylxanthine (200 mg/200 μl DMSO). Basal adenylate cyclase activity was measured in the presence of GTP (10 mM) and stimulated adenylate cyclase activity was determined replacing GTP by gucagon (3.3 10⁻⁵ to 3.3 10⁻¹⁰ M), GppNHp (10mM), forskoline (300 mM) and forskoline + GDP βs fixing it to me protein kinase (4 mg/ml) in the presence of saturated ³H cAMP (2.2 pmoles/assay). The cyclic AMP produced was measured by liquid scintillation after separation from the incubating mixture.

Statistical methods: Results were analyzed statistically by standard analysis of variance (ANOVA) using a probability level of (p) <0.05

RESULTS

Body and liver weight (Table 3): Animals fed diets containing partially hydrogenated palm oil exhibited statistically significant lower body weight (247 ± 35 g) and lower liver weight (11.7 ± 1.1 g) than did the control group (303 ± 37 g, 14.8 ± 0.9 g). N-3 PUFA and n-6 PUFA deficient animals presented reduced body weight, this reduction however, was not statistically different. Liver weight (12.7 ± 0.5) was also significantly reduced by the n-3 PUFA deficiency.

TABLE 3
DIETARY FATTY ACID EFFECTS ON BODY AND LIVER WEIGHT

PUFA	CONTROL	DIETS		T o t a l Deficient
		n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	
Body weight	302.0±37.0 ^a	275.0±36.0 ^{ab}	281.0±45.0 ^{ab}	247.0±35 ^b
Liver weight	14.8±0.9 ^a	12.7±0.5 ^c	14.7±1.7 ^a	11.7±1.1 ^b

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet= peanut oil, n-6 PUFA deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

Membrane lipid composition

Cholesterol and phospholipids (Table 4)

Statistically low cholesterol was observed in animals deficient in either n-3 PUFA or total PUFA in relation to the control group. Animals receiving the n-6 PUFA deficient diet showed no difference in cholesterol level. Phospholipid levels were statistically reduced by all dietary PUFA deficiencies studied.

TABLE 4
DIETARY FATTY ACID EFFECTS ON MEMBRANE
LIPID COMPOSITION

Parameters ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	DIETS			
	CONTROL	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
Cholesterol/ Protein	63.2 \pm 3.6 ^a	44.8 \pm 11.7 ^b	56.3 \pm 16.4 ^{ab}	35.4 \pm 11.6 ^b
Phospholipids/ Protein	466.0 \pm 48.0 ^a	258.0 \pm 55.0 ^b	212.0 \pm 16.0 ^b	214.0 \pm 26.0 ^b
CHL/PL	135.0 \pm 16.0 ^a	181.0 \pm 51.0 ^{ab}	270.0 \pm 92.0 ^b	180.0 \pm 34.0 ^b

Results are the mean \pm standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet=
peanut oil, n-6 PUFA
deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

Phospholipid classes (Table 5)

The major membrane phospholipid, phosphatidylcholine, was not modified in any group. Phosphatidylethanolamine remained slightly higher in the n-3 PUFA-deficient animals in comparison to the other groups, this difference, however, is not statistically significant. Phosphatidylserine, a minor phospholipid, was either reduced (17%) by the total PUFA deficient diet or augmented (20%) by the individual n-6 and n-3 PUFA deficient diets. The level of phosphatidylinositol was reduced in animals receiving the total PUFA deficient (35%) and the n-3 PUFA (20%) deficient diets. The diet containing the n-6 PUFA provoked a diminished level of sphingomyelin whereas the diet containing either n-3 PUFA or the two of the families produced an increase in sphingomyelin. This was reflected as a 3 fold increase of sphingomyelin level in n-6 PUFA-deficient animals than in either n-3 PUFA and (n-6+n-3) PUFA deficient animals.

Table 5
Dietary fatty acid effects on membrane phospholipid
classes

Phospholipids ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	DIETS			
	CONTROL	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
Phosphatidylcholine	56.7 \pm 3.3 ^a	55.7 \pm 5.8 ^a	53.4 \pm 4.9 ^a	57.9 \pm 8.2 ^a
Phosphatidyle- thanolamine	22.3 \pm 4.0 ^{ab}	25.0 \pm 3.2 ^a	20.0 \pm 2.1 ^b	23.0 \pm 5.4 ^{ab}
Phosphatidylserine	7.8 \pm 1.5 ^{ab}	9.4 \pm 2.4 ^a	9.6 \pm 2.9 ^a	6.5 \pm 1.9 ^b
Phosphatidylinositol	8.4 \pm 1.4 ^{ac}	7.0 \pm 0.7 ^{ab}	9.4 \pm 2.1 ^c	6.2 \pm 1.7 ^b
Sphingomyelin	4.8 \pm 0.8 ^a	2.9 \pm 0.7 ^c	7.6 \pm 2.6 ^b	6.4 \pm 1.3 ^b

Results are the mean \pm standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet=
peanut oil, n-6 PUFA
deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

Phospholipid fatty acid composition

Phosphatidylcholine (Table 6)

In general, the levels of saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) in phosphatidylcholine were not significantly modified by the diets studied.

However, both n-6 and n-3 PUFA families were reciprocally replaced by the respective fatty acid family. In fact, it was observed a reduced level of n-6 PUFA in animals receiving the diet rich in n-3 PUFA and the diet deficient in all PUFA. This observation comes primarily from the reduction of arachidonic acid level. Similarly, n-3 PUFA were reduced 50% by the diet rich in n-6 PUFA and by the total PUFA deficient diet. This n-3 PUFA family was elevated 3 fold in PC from animals receiving the n-6 PUFA deficient diet due primarily to the high level of EPA. Total (n-6 + n-3) PUFA were maintained for the n-3 PUFA deficient group but reduced for the n-6 PUFA and (n-6+n-3) PUFA groups.

The fatty acid modification mentioned above were reflected by a high n-6/n-3 ratio in the n-3 PUFA deficient animals and a pronounced n-6/n-3 ratio reduction in the n-6 PUFA deficient animals, whereas the ratio was maintained by the total PUFA deficient group.

The 22:5 n-6/22:6n-3 ratio of phospholipid membrane considered as an index of n-3 PUFA deficiency, if superior to 1, was 1.8 in animal deficient in this n-3 PUFA family. The presence of 20:3 n-9 (5% of total FA) in animals deficient in total PUFA is a sign of this kind of deficiency.

Phosphatidylethanolamine (Table 7)

The level of palmitic acid in phosphatidylethanolamine was significantly reduced by the total PUFA and the n-6 PUFA deficiencies, whereas the n-3 PUFA deficiency lead to a high level of this fatty acid. The n-6 and total deficiencies produced high levels of oleic acid (18:1 n-9). The n-6 PUFA deficient diet produced a significant reduction of 20:4 n-6, high level of the 20:5 n-3 and a reduction of the n-6/n-3 ratio.

The n-3 PUFA deficient diet produced a reduction of 22:6 n-3, high n-6/n-3 ratio, a 22:5 n-6/22:6 n-3 ratio of 1.83, indicating that the n-3 PUFA deficiency was achieved.

TABLE 6
EFFECT OF DIETARY LIPIDS ON MEMBRANE
PHOSPHATIDYLCHOLINE FATTY ACID
COMPOSITION

FATTY ACIDS (%)	DIETS			
	CONTROL	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
14:0	1.5±0.3 ^a	1.5±0.5 ^a	1.4±0.5 ^a	1.4±0.1 ^a
16:0	23.6±1.3 ^{ac}	25.8±1.6 ^{ab}	29.0±2.7 ^b	22.7±1.4 ^c
18:0	18.1±1.5 ^{ab}	17.7±2.4 ^a	16.2±2.9 ^a	18.1±1.9 ^b
ΣSFA	44.7±3.1 ^a	46.5±1.1 ^a	48.7±1.8 ^a	47.8±1.8 ^a
16:1 n-7	2.5±0.3 ^{ab}	3.2±0.9 ^a	2.0±0.3 ^b	6.1±1.4 ^c
18:1 n-9	9.0±1.6 ^a	10.7±1.8 ^a	12.7±2.8 ^b	16.2±0.8 ^b
18:1 n-7	2.6±0.6 ^{ab}	1.7±0.9 ^a	2.7±0.4 ^{ab}	2.9±0.1 ^b
ΣMUFA	15.8±1.6 ^a	16.3±1.9 ^a	18.7±4.0 ^a	26.1±0.8 ^b
18:2 n-6	6.6±0.9 ^a	5.9±0.7 ^{ac}	4.7±1.1 ^{bc}	5.2±0.3 ^b
20:3 n-6	0.4±0.1 ^a	0.5±0.2 ^{ac}	0.6±0.1 ^{bc}	1.0±0.2 ^d
20:4 n-6	22.9±2.0 ^a	23.7±2.1 ^a	5.4±1.0 ^b	7.5±1.3 ^c
22:5 n-6	1.3±0.9 ^a	2.6±0.4 ^b	0.1±0.0 ^c	1.2±0.1 ^a
ΣPUFA n-6	33.1±2.0 ^a	34.2±2.4 ^a	13.7±3.1 ^b	17.9±2.4 ^b
18:3 n-3	0.3±0.1 ^a	0.1±0.0 ^b	0.2±0.1 ^b	0.2±0.0 ^b
20:5 n-3	0.4±0.1 ^a	0.3±0.2 ^a	8.9±2.9 ^b	0.6±0.3 ^a
22:5 n-3	0.5±0.1 ^a	1.0±0.5 ^{ab}	1.2±0.3 ^b	0.2±0.0 ^c
22:6 n-3	5.2±0.4 ^a	1.4±0.4 ^b	8.5±2.3 ^c	2.2±0.4 ^d
ΣPUFA n-3	6.4±0.6 ^a	3.0±1.0 ^b	18.9±5.3 ^c	3.2±0.4 ^b
Σn-6+n-3	39.5±2.5 ^a	37.0±3.3 ^{ab}	32.6±5.0 ^b	21.2±2.4 ^c
20:3 n-9	—	—	—	5.0±0.7 ^a
n-6/n-3	5.2±0.3 ^a	12.2±4.0 ^b	0.7±0.4 ^c	5.5±1.2 ^a
22:5 n-6/22:6 n-3	0.04±0.01 ^d	1.80±0.60 ^b	0.02±0.01 ^c	0.5±0.0 ^a

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet=
peanut oil, n-6 PUFA
deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

TABLE 7
EFFECT OF DIETARY LIPIDS ON MEMBRANE
PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE FATTY ACID
COMPOSITION

FATTY ACIDS (%)	DIETS			
	CONTROL	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
14:0	4.0±1.0 ^a	2.3±0.8 ^b	6.5±0.9 ^c	3.8±1.8 ^a
16:0	30.8±4.3 ^a	38.3±3.8 ^b	24.4±3.2 ^c	24.1±2.1 ^c
18:0	16.1±0.8 ^a	15.3±2.4 ^a	16.9±1.8 ^a	16.7±4.4 ^a
ΣSFA	53.8±5.8 ^{ab}	60.0±2.9 ^b	53.9±4.1 ^a	46.7±2.9 ^a
16:1 n-7	3.9±1.5 ^a	4.8±0.7 ^a	1.7±0.5 ^b	6.4±1.9 ^a
18:1 n-9	7.0±1.6 ^a	7.1±0.4 ^a	10.8±0.8 ^b	13.9±1.0 ^c
18:1 n-7	1.5±0.2 ^a	7.2±0.0 ^b	2.2±0.4 ^c	2.1±0.8 ^{ac}
ΣMUFA	14.3±3.9 ^{ab}	13.0±0.7 ^a	17.0±0.8 ^b	24.4±2.5 ^c
18:2 n-6	4.9±0.9 ^a	2.8±0.5 ^b	4.7±5 ^{ab}	3.8±1.2 ^{ab}
20:3 n-6	0.2±0.0 ^a	0.5±0.2 ^b	0.2±0.4 ^c	0.7±0.0 ^b
20:4 n-6	16.5±3.3 ^a	15.3±3.6 ^a	3.0±0.7 ^b	11.9±2.5 ^a
22:5 n-6	0.9±0.2 ^a	2.8±1.3 ^{bd}	0.2±0.1 ^c	1.8±0.2 ^d
ΣPUFA n-6	23.8±5.4 ^a	24.0±3.5 ^a	10.9±1.4 ^b	21.8±4.8 ^a
18:3 n-3	0.5±0.1 ^a	0.2±0.1 ^b	0.4±0.1 ^a	0.2±0.0 ^b
20:4 n-3	—	0.1±0.0 ^b	6.5±1.0 ^c	0.4±0.1 ^d
20:5 n-3	0.9±0.2 ^a	0.3±0.1 ^b	2.0±0.4 ^c	0.3±0.1 ^b
22:6 n-3	5.3±1.3 ^a	1.5±0.7 ^b	8.0±1.2 ^c	3.2±0.2 ^d
ΣPUFA n-3	8.1±3.8	3.0±1.0 ^b	18.0±2.6 ^c	4.0±0.6 ^{ab}
Σn-6+n-3	31.9±4.3 ^a	26.9±2.8 ^a	29.1±3.6 ^a	26.8±3.7 ^a
20:3 n-9	—	—	—	3.1±1.3 ^a
n-6/n-3	3.2±0.7 ^a	12.0±2.6 ^b	0.6±0.1 ^c	4.6±1.5 ^a
22:5 n-6/22:6 n-3	0.08±0.03 ^a	1.83±0.52 ^b	0.02±0.01 ^c	0.4±0.2 ^a

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet=
peanut oil, n-6 PUFA
deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

The total (n-6+n-3) PUFA-deficiency produced a high level of 20:3 n-9 (3.1%), however, neither the n-6/n-3 ratio nor the sum of total PUFA (n-6+n-3) were modified. In phosphatidylethanolamine the sum of PUFA was not modified by the deficiencies studied here.

Phosphatidylserine (Table 8)

The deficiencies studied presented no effects on the sum of saturated and monounsaturated fatty acids in the composition of phosphatidylserine. The n-6 PUFA deficient diet produced a significant reduction of the level of n-6 PUFA (20:4), a high level of n-3 PUFA and no effects on the sum of total PUFA (n-6+n-3). The n-3 PUFA deficient diet produced a high level of n-6 PUFA in PS (20:4 and 22:5), reduced levels of n-3 PUFA and a high n-6/n-3 ratio. Eicosatrienoic acid (20:3 n-9) was present as well in phosphatidylserine from animals receiving the diet deficient in total PUFA.

TABLE 8
EFFECT OF DIETARY LIPIDS ON MEMBRANE
PHOSPHATIDYLSERINE FATTY ACID
COMPOSITION

FATTY ACIDS (%)	DIETS			
	CONTROL	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
14:0	3.8±1.0 ^a	2.3±0.6 ^b	3.4±0.9 ^a	2.2±0.4 ^b
16:0	25.9±1.5 ^a	23.8±2.1 ^a	24.4±2.7 ^a	26.9±5.4 ^a
18:0	21.2±3.3 ^a	21.8±3.4 ^a	21.6±1.7 ^a	19.7±4.3 ^a
ΣSFA	56.8±2.8 ^a	51.9±3.3 ^a	53.7±2.6 ^a	52.7±4.6 ^a
16:1 n-7	6.3±1.2 ^a	4.4±1.4 ^a	1.7±0.5 ^b	8.9±2.8 ^a
18:1 n-9	10.7±0.5 ^a	13.4±1.9 ^b	11.5±3.1 ^{ab}	13.9±1.6 ^b
18:1 n-7	1.2±0.0 ^a	0.2±0.1 ^b	1.6±0.4 ^a	0.0±0.0 ^b
ΣMUFA	19.8±1.5 ^a	20.0±2.6 ^a	21.0±1.1 ^a	23.1±2.2 ^a
18:2 n-6	3.4±0.4 ^a	3.4±1.1 ^a	3.5±1.0 ^a	3.4±0.1 ^a
22:6 n-6	3.3±1.5 ^{ab}	2.5±0.5 ^a	5.3±1.0 ^b	2.9±0.4 ^a
20:3 n-6	0.4±0.1 ^a	1.3±0.9 ^b	0.4±0.1 ^a	0.7±0.0 ^c
20:4 n-6	11.2±1.4 ^a	14.3±2.5 ^a	3.2±0.8 ^b	7.4±1.9 ^c
22:5 n-6	0.4±0.2 ^a	2.9±0.9 ^b	0.2±0.1 ^a	1.8±0.2 ^c
ΣPUFA n-6	18.5±1.3 ^a	24.7±3.2 ^b	13.8±1.6 ^c	17.6±5.4 ^{abc}
18:3 n-3	0.3±0.1 ^a	—	1.1±0.5 ^b	0.5±0.2 ^{ab}
20:5 n-3	0.5±0.1 ^a	0.2±0.1 ^a	2.6±0.6 ^c	0.4±0.1 ^a
22:5 n-3	0.4±0.0 ^a	0.1±0.0 ^b	1.1±0.4 ^c	0.1±0.0 ^b
22:6 n-3	3.5±0.6 ^a	1.7±0.4 ^b	6.5±1.1 ^c	2.6±0.8 ^{ab}
ΣPUFA n-3	4.9±0.3 ^a	3.4±1.0 ^b	11.5±1.8 ^c	3.9±1.5 ^{ab}
Σn-6+n-3	22.4±1.5 ^a	28.11±2.7 ^b	25.3±2.5 ^{ab}	21.5±2.7 ^a
20:3 n-9	—	—	—	2.7±0.4 ^a
n-6/n-3	3.6±0.2 ^a	10.2±3.3 ^b	1.2±0.2 ^c	4.5±1.8 ^a
22:5 n-6/22:6n-3	0.10±0.03 ^a	1.64±0.53 ^b	0.02±0.01 ^c	0.5±0.2 ^a

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet= peanut oil, n-6 PUFA deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

Phosphatidylinositol (Table 9)

The level of palmitic acid (16:0) in phosphatidylinositol was significantly higher (2 fold) in animals fed a total PUFA deficient diet as compared to animals taking the control diet. However, the level of oleic acid (18:1 n-9) was reduced by the total PUFA deficient diet. Even though, the sum of n-6 PUFA in PI was not modified by the diet deficient in n-3 PUFA, the level of 20:4 n-6 was reduced 31%. This was compensated by the high level of 22:5 n-3. The n-6 PUFA deficient diet, however, produced a reduction of the level of this family. The levels of the n-3 PUFA family in PI was high in the lot deficient in n-6 PUFA and low in the n-3 PUFA and total PUFA lots. The sum of PUFA was strikingly reduced by the total PUFA-deficient diet.

TABLE 9
EFFECT OF DIETARY LIPIDS ON MEMBRANE
PHOSPHATIDYLINOSITOL FATTY ACID
COMPOSITION

FATTY ACIDS (%)	DIETS			
	CONTROL	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
14:0	3.9±1.1 ^a	2.9±1.0 ^a	3.7±1.1 ^a	3.5±0.7 ^a
16:0	25.2±5.5 ^a	28.2±7.2 ^a	21.7±4.1 ^a	52.1±10.0 ^b
18:0	20.4±5.2 ^a	17.8±2.4 ^a	18.3±3.0 ^a	13.5±4.7 ^a
ΣSFA	53.6±4.5 ^a	52.2±7.1 ^a	46.2±6.6 ^a	71.9±6.4 ^b
16:1 n-7	4.4±1.0 ^a	6.9±1.4 ^b	6.7±2.2 ^{ab}	4.7±0.6 ^a
18:1 n-9	9.6±2.8 ^{ab}	14.8±3.8 ^a	13.5±4.8 ^a	7.3±2.3 ^b
18:1 n-7	1.2±0.3 ^a	0.4±0.1 ^b	1.4±0.8 ^a	1.2±0.4 ^a
ΣMUFA	16.8±3.4 ^a	23.5±3.6 ^b	25.6±3.7 ^b	14.2±3.2 ^a
18:2 n-6	3.6±0.4 ^a	3.8±1.2 ^a	4.0±1.0 ^a	2.2±1.0 ^b
20:2 n-6	1.8±0.5 ^a	0.9±0.4 ^b	3.9±1.0 ^c	2.1±0.3 ^a
20:3 n-6	1.0±0.7 ^{ab}	2.5±1.4 ^a	0.3±0.0 ^b	0.4±0.3 ^b
20:4 n-6	16.1±2.0 ^a	12.3±2.3 ^b	10.4±2.9 ^b	3.3±1.7 ^c
20:5 n-6	0.5±0.2 ^a	2.0±1.0 ^b	0.9±0.3 ^b	0.3±0.2 ^a
ΣPUFA n-6	26.2±2.3 ^a	22.7±3.1 ^{ab}	19.0±5.0 ^b	9.0±3.5 ^c
18:3 n-3	0.4±0.2 ^a	0.0±0.1 ^{ac}	1.5±0.8 ^b	0.2±0.0 ^c
20:5 n-3	1.0±0.7 ^a	0.2±0.1 ^b	0.9±0.1 ^a	0.4±0.1 ^c
22:6 n-3	1.4±0.3 ^a	1.0±0.3 ^{ac}	5.3±2.3 ^b	0.7±0.3 ^c
ΣPUFA n-3	3.4±0.6 ^a	1.6±0.5 ^{bd}	9.2±2.7 ^c	2.0±0.3 ^d
Σn-6+n-3	29.6±2.4 ^a	24.3±3.8 ^b	28.2±7.3 ^{ab}	11.0±3.2 ^c
20:3 n-9	—	—	—	2.9±1.4 ^a
n-6/n-3	7.7±1.7 ^a	11.0±2.1 ^b	2.1±0.5 ^c	4.5±2.7 ^c
22:5 n-6/22:6n-3	0.30±0.10 ^a	1.42±0.60 ^b	0.23±0.08 ^a	0.40±0.20 ^a

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet= peanut oil, n-6 PUFA deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

Sphingomyelin (Table 10)

The level of this minor phospholipid appears to be significantly influenced by dietary PUFA. These modification in composition were even observed at the level of monounsaturated fatty acids where oleic acid was largely increased by the three types of PUFA deficiencies studied. However, it was the PUFA content which was mostly affected. In fact, the level of arachidonic acid (20:4 n-6) was significantly reduced by the three types of deficiency. This reduction, already observed in PI was not compensated by the level of 22:5 n-6 in the animals fed the n-6 and total PUFA deficient diet. N-3 PUFA were, as expected, reduced by the n-3 PUFA deficient diet and elevated by the n-6 PUFA deficient diet. It was also observed a 40% reduction in total PUFA whatever the dietary PUFA deficiency analyzed. The n-6 / n-3 ratio, was not modified by the n-3 PUFA deficiency but reduced by the n-6 and total PUFA deficiencies. The 22:5 n-6 / 22:6 n-3 ratio was very high (19 fold) in SPh from n-3 PUFA and total PUFA deficient animals.

TABLE 10
EFFECT OF DIETARY LIPIDS ON MEMBRANE
SPHINGOMYELINE FATTY ACID COMPOSITION

FATTY ACIDS (%)	DIETS			
	CONTROL	n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
14:0	3.6±0.6 ^a	3.2±1.9 ^a	3.9±1.9 ^a	3.3±0.9 ^a
16:0	30.8±2.4 ^a	33.0±4.0 ^{ab}	38.1±3.9 ^b	31.0±1.0 ^a
18:0	16.0±4.4 ^a	13.7±2.1 ^a	10.0±1.9 ^b	20.3±3.2 ^a
ΣSFA	54.7±3.8 ^a	53.0±5.6 ^a	57.1±2.6 ^a	58.3±2.4 ^a
16:1 n-7	5.9±1.3	5.8±2.2 ^a	6.3±0.6 ^a	6.8±1.5 ^a
18:1 n-9	11.1±2.4 ^a	19.7±4.2 ^b	19.3±4.8 ^b	15.7±2.0 ^b
18:1 n-7	2.3±0.2 ^a	1.1±0.1 ^b	1.0±0.1 ^b	—
ΣMUFA	19.9±1.0 ^a	31.2±6.0 ^b	27.9±2.5 ^b	23.0±3.1 ^a
18:2 n-6	4.8±1.4 ^a	4.2±1.4 ^a	4.2±0.8 ^a	3.9±0.5 ^b
20:2 n-6	1.8±0.2 ^a	0.7±0.2 ^b	0.6±0.3 ^b	2.0±0.2 ^a
20:3 n-6	0.3±0.1 ^a	1.4±0.6 ^b	0.2±0.0 ^a	0.2±0.1 ^a
20:4 n-6	9.8±1.4 ^a	4.6±0.4 ^b	2.4±0.2 ^c	3.6±1.3 ^{bc}
20:5 n-6	0.2±0.1 ^a	2.5±1.0 ^b	—	0.7±0.3 ^d
ΣPUFA n-6	21.4±4.5 ^a	13.0±2.3 ^b	8.2±0.7 ^c	12.0±1.2 ^b
18:3 n-3	0.4±0.0 ^a	0.2±0.1 ^b	0.8±0.0 ^c	0.4±0.1 ^a
20:5 n-3	1.2±0.4 ^a	0.6±0.2 ^b	2.2±0.1 ^c	1.8±0.2 ^d
22:5 n-3	0.2±0.0 ^a	0.2±0.1 ^a	0.5±0.1 ^b	0.5±0.3 ^b
22:6 n-3	2.2±0.4 ^a	1.4±0.9 ^{ab}	3.3±0.6 ^c	0.9±0.2 ^b
ΣPUFA n-3	4.0±0.4 ^a	2.8±0.6 ^b	6.8±0.3 ^c	3.8±0.2 ^a
Σn-6+n-3	25.4±4.6 ^a	15.8±2.0 ^b	15.0±1.0 ^b	15.8±1.1 ^b
20:3 n-9	—	—	—	2.9±1.4 ^a
n-6/n-3	5.5±1.1 ^a	5.2±1.4 ^a	1.6±0.0 ^b	3.2±0.4 ^c
22:5 n-6/22:6 n-3	0.09±0.06 ^a	1.72±0.20 ^b	—	0.70±0.30 ^c

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet=
peanut oil, n-6 PUFA
deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

Enzyme activities**5'Nucleotidase activity** (Table 11)

The specific of 5' nucleotidase in hepatic plasma membrane was independent of dietary PUFA. In fact, its activity varied in a range from 98 to 110 μmol protein/h.

TABLE 11
DIETARY FATTY ACID EFFECTS ON PLASMA
MEMBRANE 5'NUCLEOTIDASE ACTIVITY

ACTIVITY	CONTROL	DIETS		Total PUFA Deficient
		n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	
μmolesPO4 mg prot.-h	106.0±18.0 ^a	98.0±13.5 ^a	110.0±15.0 ^a	105.0±19.0 ^a

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet=
peanut oil, n-6 PUFA
deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil.

Adenylate Cyclase (Table 12)

Basal adenylate cyclase activity in hepatic plasma membrane was not modified by the dietary treatments. There was, however, a significant difference in basal activity between total PUFA and n-6 PUFA-deficient animals.

Forskoline and glucagon stimulated adenylate cyclase was not influenced by dietary PUFA deficiencies. However, GppNHp stimulated activity through the regulatory unit of the enzyme was highly reduced by the n-6 PUFA deficient diet, and augmented by the n-3 PUFA deficient diet. The enzyme activity from the n-6 PUFA deficient animals was reduced as compared to the activity from the total and n-3 PUFA deficient animals. On the other hand, the activity of the enzyme stimulated by the forskoline + GDP βs, which gives information on the catalytic unit, was augmented by the total PUFA deficient diet.

TABLE 12
DIETARY FATTY ACID EFFECTS ON PLASMA
MEMBRANE ADENYLATE CYCLASE ACTIVITY

	CONTROL	DIETS		
		n-3 PUFA Deficient	n-6 PUFA Deficient	Total PUFA Deficient
pmoles cAMP/mg protein minute				
Basal Stimulated:	11.0±2.5 ^{ab}	11.0±3.0 ^{ab}	9.8±1.0 ^b	13.0±2.5 ^a
Glucagon				
3.3 10 ⁻¹⁰ M	62.0±22.0 ^a	72.0±22.0 ^a	60.0±15.0 ^a	61.0±14.0 ^a
3.3 10 ⁻⁹ M	80.0±28.0 ^a	76.0±23.0 ^a	72.0±18.0 ^a	71.0±16.0 ^a
3.3 10 ⁻⁸ M	91.0±32.0 ^a	79.0±24.0 ^a	51.0±13.0 ^a	76.0±17.0 ^a
3.3 10 ⁻⁷ M	103.0±37.0 ^a	87.0±26.0 ^a	82.0±18.0 ^a	89.0±20.0 ^a
3.3 10 ⁻⁶ M	139.0±51.0 ^a	140.0±42.0 ^a	146.0±36.0 ^a	141.0±33.0 ^a
3.3 10 ⁻⁵ M	162.0±60.0 ^a	156.0±46.0 ^a	152.0±38.0 ^a	150±34.0 ^a
GppNHp ¹	150.0±35.0 ^a	196.0±34.0 ^a	92.0±28.0 ^c	191.0±49.0 ^{ab}
Forskolin	79.0±17.0 ^a	74.0±24.0 ^a	93.0±17.0 ^a	71.0±23.0 ^a
Forskoline + GDPβs ²	27.0±8.0 ^a	21.0±6.0 ^a	24.0±8.0 ^a	38.0±10.0 ^b

Results are the mean ± standard deviation
control diet= mixture of peanut and rapeseed oil, n-3 PUFA deficient diet=
peanut oil, n-6 PUFA
deficient diet= cod liver oil, total deficient diet= hydrogenated palm oil. 1.
Guanydyli-imidoliphosphate, 2. Guanydyli-diphosphate βs

DISCUSSION

In our study, the levels of cholesterol and phospholipids were reduced by the n-3 and total PUFA deficiencies whereas the n-6 PUFA dietary deficiency reduced only the level of phospholipids. Flier et al (11) found that an excess of n-3 PUFA had no effect on the hepatic plasma membrane phospholipid content in animals. Similarly, Zuniga and Kinsella (12) did not find any correlation between the levels of cholesterol and phospholipids in plasma membrane and the type of lipids in the diet. However, it is important to notice that the control group used in these two studies was a n-3 PUFA-deficient group. Therefore, the comparison was made between two deficiencies (n-6 and n-3 PUFA). As such our results are comparable to those of Zuniga and Kinsella.

According to our results, the levels of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were not modified by the type of dietary lipids. On the contrary, phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI) and sphingomyeline (Sph) were largely modified by the type of dietary PUFA deficiency. In fact, the total PUFA deficiency diminished the level of PS, and PI and augmented the level of Sph. The n-6 PUFA deficiency provoked high levels of Sph. Finally, the n-3 PUFA deficiency produced low levels of Sph. We found no reports regarding the levels of phospholipid classes in hepatic plasma membranes to compare them with our results. It is very interesting, however, to observe the significance of dietary PUFA on the proportion of minor phospholipid classes. Notice also that the n-6 and n-3 PUFA deficiencies have the same effect on PS but opposite effects on PI and Sph.

Concerning the fatty acid composition of each phospholipid classes, it was observed that the 85 mg of 18:2 n-6 present in the total PUFA deficient diet was not sufficient to maintain the level of the sum of PUFA in PC, PI and Sph. Similarly, the quantity of PUFA (1g) present in each dietary specific PUFA deficiency (n-6 or n-3) was supposed to be adequate to maintain, by replacement of one family by the other, the sum of PUFA in membrane phospholipids. Nevertheless, this sum was modified in three phospholipids due to n-3 PUFA deficiency and in two phospholipids due to n-6 PUFA deficiency. These results showed either certain priority among phospholipids or difficulty of replacement between the two PUFA families.

The n-6/n-3 ratio was expected to be systematically reduced by the n-6 PUFA deficiency and increased by the n-3 and total PUFA deficiencies. Results were confirmed in the case of n-6 PUFA deficiency. However, the sphingomyeline found in the group of n-3 PUFA deficient animals had no modification in this ratio and phospholipids from the total deficient group presented ratios totally unexpected. Only a few works have been reported over the past few years on the fatty acid composition of phospholipid classes of hepatic plasma membranes. Some authors reported either the fatty acid composition of total phospholipids or the fatty acid composition

of PC and PE. These two phospholipids are, however, modified only slightly by diet as reported in this work, whereas the minor phospholipids PS, PI and Sph can be largely modified by diet. Our results are in accordance to those by Brivio-Haugland et al (2) where total deficient diets produced an accumulation of 16:1 n-7 and 20:3 n-9 and a reduction of 18:2 and 20:4 n-6. Zuniga and Kinsella (12) have reported, as in our study, a reduction of the n-6 PUFA family and an augmentation of the n-3 PUFA family. The opposite effect was observed in phospholipids from animals fed the n-3 PUFA deficient diet. However, the fatty acid composition of Sph was not reported in those two studies.

In spite of the large modification in fatty acid composition, the 5' nucleotidase activity was not modified at all. This is probably due to the fact that the 5' nucleotidase activity is favored by a PC membrane environment which was not modified in our study. Our results are in contradiction to those of Monchilova et al (4) and Brivio-Haugland et al. (2) in which the 5' nucleotidase activity was either higher or lower respectively. The authors however did not present the fatty acid composition of diets nor the fatty acid composition of phospholipid classes. Flier et al (11) reported a high 5' nucleotidase activity in hepatic plasma membrane from animals receiving a diet rich in n-3 PUFA in comparison to a saturated diet. Zuniga and Kinsella (7) did not report any effect on enzyme activity by using the same type of diet. However, in 1989, the same authors showed higher 5' nucleotidase activity in animals under a diet rich in n-3 PUFA than in animals receiving a diet rich in n-6 PUFA or totally deficient (12). In conclusion, the few works done on the effects of membrane fatty acid composition are not reliable enough to reject our results which show that the phospholipid fatty acid composition did not influence the 5' nucleotidase activity except in the case of extreme excess which concerns more toxicological than nutritional modifications.

Adenylate cyclase complex carries a receptor unit, a catalytic unit and a regulator unit. The effects of dietary PUFA on the three units were analyzed by the effectors 1) glucagon, 2) GppNHp 3) forskoline and 4) forskoline + GDPβs which work respectively on 1) receptor unit, 2) regulator unit, 3) catalytic unit, through the regulator unit and 4) catalytic unit per se.

Basal adenylate cyclase activity was not modified by dietary deficiencies in relation to the control group but it was, however, highly reduced by the n-6 PUFA deficiency in comparison to the activity of the total deficient group.

Dietary PUFA, whatever the type, had no effect on adenylate cyclase activity stimulated by glucagon or forskoline. Therefore, the receptor unit and the catalytic unit modulated through the regulator unit do not appear to be sensible to the PUFA modifications in hepatic plasma membrane phospholipids. The protein G unit, regulator unit, stimulated by GppNHp, was largely reduced by dietary n-6 PUFA deficiency and augmented by the dietary n-3 PUFA deficiency in comparison to the activity of all other groups. Finally, the

adenylate cyclase activity modulated by the catalytic unit (Forskoline+GDPβs) was significantly increased by the total PUFA deficiency.

Our results are in contradiction to those of Brivio-Haugland et al (2) that showed a reduction in adenylate cyclase activity basal and stimulated by the glucagon in animals receiving a totally PUFA deficient diet. Houslay and Palmer (22) and Calorini et al (28) have reported that the adenylate cyclase activity stimulated by the glucagon can be modulated by the proportions of membrane phosphatidylcholine. In our study, we did not show any modification of either phosphatidylcholine or enzyme activity through glucagon by dietary PUFA.

The research group of Clandinin has shown in rat a direct relationship between adenylate cyclase activity stimulated by glucagon and the content of 18:2 n-6 (23,24) or 18:3 n-3 content (9). However, even though our results are in accordance to those of Clandinin concerning membrane lipid modifications, adenylate cyclase activity stimulated by glucagon were independent of PUFA dietary deficiency.

Finally, Lee and Hamm (10) reported a stimulating effect of n-3 PUFA on NaF and forskoline adenylate cyclase activity. The conclusions of these authors were that dietary PUFA have a direct incidence on the catalytic and the regulator (protein G) units and have no incidence on the receptor unit due primarily to the unchanged receptor numbers. However these results were not validated by Dax et al (26) whose conclusions were, as ours, that dietary PUFA had no influence on adenylate cyclase activity stimulated by glucagon and forskoline. Very recently, Alam et al (27) studied the reversal effect of diet induced modification on adenylate activity in the heart membrane in which they showed that the adenylate cyclase activity was only partially restored even though the membrane fatty acid composition was restored to normal. They postulate the need of the enzyme activity for a specific phospholipid environment for instance phosphatidylcholine as put in evidence by Calorini et al (28).

In conclusion, our results show that each dietary PUFA deficiency modifies differently the proportions of phospholipid classes and their fatty acid composition. The mechanism responsible for these modifications remain to be elucidated. The protein G (GppNHp) and the catalytic unit of adenylate cyclase complex appear to be sensitive to alterations in PUFA membrane composition.

REFERENCES

- Chandrasekhara N., Narayan K.A. Rat liver plasma membranes in essential fatty acid deficiency. *J. Nutr* 100, 477-480, 1970.
- Brivio-Haugland R.P., Lowis S.L., Mush K., Waldeck N., Williams M.A. Liver plasma membranes from essential fatty acid deficient rats. Isolation fatty acid composition and activities of 5' nucleotidase. ATPase and adenylate cyclase.
- Alam S.Q., Alam B.S. Acylgroup composition of lipids and the activities of Na+K+ATPase, 5' Nucleotidase and lutamyltransferase in salivary glands and kidneys of rats fed diets containing different dietary fats. *Biochim. Biophys. Acta*, 758, 1-9, 1983.
- Momchilova A., Petkova D., Mechev I., Dimitrov G., Koumanov K. Sensivity of 5' Nucleotidase and phospholipase A2 toward liver plasma membrane modifications. *Int J. Biochem*, 17, 7, 787-792, 1985.
- Awad A.B., Chattopadhyay J.P. Effect of dietary fats on the lipid composition and enzyme activities of rat cardiac sarcolemma. *Nutr.* 113, 1878-1884, 1983.
- Daveloose D., Linard A., Arfi T., Viret J. and Christon R. Simultaneous changes in lipid composition fluidity and enzyme activity in piglet intestinal brush border membrane as affected by dietary polyunsaturated fatty acid deficiency. *Biochem. Biophys. Acta* 1166 (2-3):229-237, 1993.
- Zuniga M.E., Lokesh B.R., Kinsella J.E. Effect of dietary N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids on composition and enzyme activities in liver plasma membrane of mice. *Nutr. Res.* 8, 1051-1059, 1988.
- Baraca A., Barzanti V., Lenaz G., Solaini G. Dietary lipids and 5' nucleotidase activity of rat cell plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 199, 1, 99-105, 1994.
- Morson L.A. and Clandinin M.T. Diet varying in linoleic acid and linolenic acid content alter liver plasma membrane lipid composition and glucagon stimulated adenylate cyclase activity. *J. Nutr.* 116, 2355-2362, 1986.
- Lee C.R., Hamm M.W. Effect of dietary fat and cholesterol supplements on glucagon receptor binding and adenylate cyclase activity of rat liver plasma membrane. *J. Nutr.* 119, 539-564, 1989.
- Flier J., Lokesh B.R., Kinsella J.E. Increased 5' Nucleotidase activity in plasma membrane from rat liver following ingestion of fish oil. *Nutr. Res.*, 5, 277-283, 1985.
- Zuniga M.E., Lokesh B.R., Kinsella J.E. Disparate effects of dietary fatty acids on activity of 5' Nucleotidase of rat liver plasma membranes. *J. Nutr.* 119, 152-160, 1989.
- Alam S.Q., Ren Y.F., Alam B.S. (³H) Dinydroalprenolol-binding sites and adenylate cyclase activity in heart of rats fed diets containing different oils. *Lipids*, 23, 207-213, 1988.
- Epping R.J., Bygrave F.L. A procedure for the rapid isolation from rat liver of plasma membrane exhibiting Ca²⁺-transport and Ca²⁺-atpase activities. *Biochem J.* 223, 733-745, 1984.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Biol. Chem.* 226, 497-506, 1957.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.
- Wolff R. Mise au point sur le dosage enzymatique des esters de cholesterol a chaines polyunsaturés très longues. *Rev. Franç. Des Corps Gras*, 32, 3, 111-115, 1985.
- Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem* 234, 466-468, 1959.
- Morrison W.R. and Smith L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Research*, 5, 600-608, 1964.
- Avruch J., Wallach H.F.D. Preparation and properties of plasma membrane and endoplasmic reticulum fragments from isolated rat cells. *Biochim. Biophys. Acta* 233, 334-337, 1971.
- Salesse R. Modulation de l'activité de l'adenylate cyclase par l'état Physique de la membrane erythrocytaire de pigeon. These de doctoral d'état, Université Paris XI, 1986.

22. Houslay M.D., Palmer R.W. Lysophosphatidylcholines can modulate the activity of glucagon-stimulated adenylate cyclase from rat liver plasma membranes. *Biochem J.*, 178, 217-221, 1979.
23. Neelands P.J., Clandinin M.T. Diet fat influences liver plasma membrane lipid composition and glucagon-stimulated adenylate cyclase activity. *Biochem J.* 212, 573-583, 1983.
24. Morson L.A., Clandinin M.T. Dietary linoleic acid modulates liver plasma membrane unsaturated fatty acid composition, phosphatidylcholine and cholesterol content as well as glucagon stimulated adenylate cyclase activity. *Nutr Res.* 5, 1113-1120, 1985.
25. Alam S.Q., Alam B.S., Ren Y.F. Adenylate cyclase activity, membrane fluidity and fatty acid composition of rat heart in essential fatty acid deficiency *J. Mol. Cell Cardiol.* 19, 465-47, 1987.
26. Dax E.E., Partilla J.S., Pineyro A.M., Grefeman R.I. Altered glucagon and catecholamine hormone sensitive adenylyl cyclase responsiveness in rat liver membranes induced by manipulation of dietary fatty acid intake. *Endocrinology*, 127, 2236-2240, 1990.
27. Alam B.S., Mannino S.J., Alam S.Q. Effect of reversal of diet-induced changes in acyl group composition of cardiac membrane lipids on adenylate cyclase activity in rats. *J. Nutr. Biochem.* 5:106-112, 1994.
28. Calorini L., Mugnai G., Mannini A., and Ruggieri S. Effect of phosphatidylcholine structure on the adenylate cyclase activity of murine fibroblast cell line. *Lipids* 28, 27-730, 1993.

Recibido : 23-01-1995

Aceptado: 01-09-1995

Interação de zinco e vitamina A em ratos na lactação. Modelo de deficiência experimental

Lucia Kiyoko Ozaki Yuyama¹ y Silvia Maria Franciscato Cozzolino²

RESUMO. Desenvolveu-se um modelo experimental de deficiência de zinco e vitamina A em ratos, no período de lactação, logo após o nascimento dos animais. O delineamento consistiu de um período de depleção de 4 semanas após o nascimento. Os animais do grupo teste receberam ração á base de caseína deficiente em zinco e vitamina A e os do grupo controle a ração padrão segundo as recomendações do «Committee on Laboratory Animal Diets». Foram utilizadas ratas adultas pós-parto, *Rathus norvegicus*, var. *albinus*, (*Rodentia Mammalia*), com 6 filhotes machos cada, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da USP. Ao final do período de depleção, verificou-se que o peso dos animais do grupo controle (109,1 g \pm 3,9g) foi significativamente superior aos dos grupo teste (40,8g \pm 6,7g). Da mesma forma a concentração de zinco nos fêmures dos animais do grupo controle (115,7 μ g/g \pm 5,4 μ g do osso) foi significativamente superior á dos animais do grupo teste (35,5 μ g/g \pm 3,3 μ g/g). A concentração de vitamina A no plasma dos animais do grupo controle (31,5 μ g/dL \pm 2,5 μ g/dL) também foi significativamente superior quando comparada á dos animais do grupo teste (8,9 μ g/dL \pm 3,4 μ g/dL), entretanto a concentração de vitamina A hepática foi semelhante para os dois grupos. Pelos resultados obtidos podemos concluir que houve interação de zinco e vitamina A a nível de mobilização de vitamina A do fígado e depleção de zinco. Embora a concentração plasmática de vitmaina A tivesse indicado uma depleção, esta não pode ser considerada total tendo em vista as reservas hepáticas.

INTRODUÇÃO

A deficiência de zinco na dieta no período da lactação, resulta na redução da produção láctea bem como na concentração de zinco no leite. Consequentemente, os filhotes

SUMMARY. Interaction of vitamin A and zinc in lactating rats. **Experimental deficiency model.** An experimental deficiency model of vitamin A and zinc in lactating rats was developed. The experimental design consisted in a depletion period of 4 weeks immediatly after birth where test group animal received a casein based feed, deficient in zinc and vitamin A, and a control feed according to the recommendations of the Committee on Laboratory Animal Diets. Female *Rathus norvegicus*, var. *albinus* (*Rodentia, Mammalia*) with 6 young males each were used. These came from the Biotério of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas of USP. At the end of the depletion period it was found that the weight of the males control group (109,1 g \pm 3,9 g) was significantly greater than that of the test group (40,8 g \pm 6,7 g). The same was true for the concentration of zinc in the femurs of these animals, in the control group the concentration was significantly greater (115,7 μ g/g \pm 5,4 μ g/g) than in the test group (35,5 μ g/g \pm 3,3 μ g). The concentration of vitamin A in the plasma of the control group (31,5 μ g/dL \pm 2,5 μ g/dL) also was significantly greater than the test group animals (8,9 μ g/dL \pm 3,4 μ g/dL). The concentration of hepatic vitamin A was similar for both groups. We can conclude that there was interaction of zinc and vitamin A, by liver and depletion in zinc. Although the plasmatic concentration of vitmain A indicates a depletion, this cannot be considered as total because of the hepatic reserves.

recebem menor quantidade deste mineral e apresentam sintomas de deficiência, como, redução da concentração plasmática do elemento, redução do crescimento e elevação da taxa de mortalidade (1).

Quanto a vitamina A, estudos indicam que a maior transferência de vitamina A da mãe para os filhotes ocorre no período da lactação, através do aleitamento materno. Assim, o estado nutricional relacionado a vitamina A das ratas e dos filhotes é influenciado pela ingestão de vitamina A na dieta (2).

A deficiência de zinco e vitamina A em ratos no período

1 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, CPCS. Estrada do Aleixo, 1756, Manaus AM. CEP. 69011-000. Brasil.
2 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Nutrição. Av. Prof. Lineu Prestes, 580. USP. São Paulo. CEP. 05508-900. Brasil.

de lactação, são raros na literatura, entretanto, alguns trabalhos tem mostrado que a maior teratogenicidade da deficiência concomitante desses dois nutrientes ocorre no período de gestação e são resultantes da interação entre estes nutrientes (3).

No sentido de se avaliar a interação entre zinco e vitamina A em ratos recebendo dietas deficientes nestes dois nutrientes, nos propusemos a desenvolver um modelo experimental a partir do nascimento, que nos possibilitasse a obtenção de animais depletados nestes dois nutrientes.

MATERIAL E METODOS

Animais e rações: No estudo de depleção de zinco e vitamina A no período de lactação, utilizou-se 10 ratas adultas, pós-parto, (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, *Rodentia mammalia*), com 6 filhotes machos cada, provenientes da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, subdivididos em grupos controle e teste. Os filhotes e suas respectivas mães receberam uma ração completa à base de caseína (Grupo Controle) e uma ração à base de caseína deficiente em zinco e vitamina A (Grupo Teste), de acordo com as recomendações do «Committee on Laboratory Animal Diets» (4), segundo a Tabela 1.

TABELA 1
COMPOSIÇÃO PERCENTUAL BÁSICA DAS RAÇÕES
A BASE DE CASEÍNA*

Componentes	Ração controle	Ração deficiente em Zn e vit. A
Proteína	18,0 ± 0,2	19,3 ± 1,3
D.L. Metionina	0,3	0,3
Oleo de soja	5,0	5,0
Celulose	5,0	5,0
Sacarose	10,0	10,0
Mistura vitamínica	1,0	1,0 ¹
Mistura salina	3,5	3,5
Zinco (mg%)	3,6 ± 1,5	0,5 ± 0,3
Bitartrato de colina	0,2	0,2
Amido (q.s.p. 100%)	55,0	55,0

* Caseína lavada com ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1%, por duas vezes e água desionizada por dez vezes.

1 Mistura vitamínica sem adição de vitamina A.

2 Mistura salina sem adição de zinco.

Durante o período de depleção, foi oferecida ração deficiente em zinco e vitamina A e água desionizada, tanto para as ratas mães como para os filhotes, sendo a ingestão do animal «ad libitum». O controle de peso dos animais foi semanal e o da ração a cada 2 dias.

METODOS

Lavagem de vidrarias: A fim de minimizar a contaminação por metais, especialmente o mineral em estudo, toda a vidraria foi lavada inicialmente com extran 5%, enxaguada por no mínimo 6 vezes com água desionizada e colocada em solução de ácido nítrico a 30% sendo assim mantida por no mínimo 12 horas. Em seguida foi enxaguada com água desionizada por no mínimo 6 vezes e seca em estufa com temperatura controlada. Os comedouros e outros materiais de aço inoxidável como as bandejas da estufa ventilada, bicos de bebedouros e acessórios do moinho e homogeneizador, seguiram o mesmo processo anteriormente descrito, diferindo apenas na solução utilizada para a desmineralização que foi o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1%.

Ração: A caseína utilizada foi previamente lavada com EDTA 1% segundo a Tabela 2, devido ao fato da mesma originalmente possuir 21 µg Zn/g. O procedimento utilizado na lavagem da caseína seguiu as recomendações da literatura e as otimizadas no laboratório de Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas com algumas modificações em relação ao de Mazza (5).

TABELA 2
PROCEDIMENTO PARA A LAVAGEM DE CASEÍNA

Produto	Etapas
Caseína comercial integral (2 kg)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Caseína + 8 litros de solução aquosa de EDTA 1%. 2. Agitação por 20 minutos com homogeneizador elétrico 3. Decantação e filtração. 4. Caseína + 6 litros de solução aquosa de EDTA 1% 5. Agitação por 20 minutos 6. Decantação e filtração
* Operação realizada por 10 vezes	<ol style="list-style-type: none"> *7. Caseína + 6 litros de água desionizada. *8. Agitação por 20 minutos. *9. Decantação e filtração. 10. Estufa ventilada à 60 °C por uma noite para a secagem. As bandejas de aço inoxidável foram previamente desmineralizadas com EDTA 1% e com água desionizada por 6 vezes. 11. Pulverização da caseína em moinho elétrico, acondicionamento em sacos plásticos hermeticamente fechados, e conservação em geladeira até o momento de utilização.

Material biológico: Para a obtenção do plasma, o sangue foi coletado pela artéria abdominal com a utilização de agulha descartável e recolhido diretamente em tubo de centrífuga heparinizado após anestesia do animal por inalação com éter

etílico p.a. Em seguida, foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O plasma assim obtido foi acondicionado em microtubo de polietileno de 1,5 mL, previamente lavado e desmineralizado e armazenado em freezer a -70 °C até a análise.

Imediatamente após a coleta sanguínea, o fígado foi removido, enxaguado em solução salina geleada e acondicionado em freezer a -70 °C até a análise.

Os fêmures, após a remoção, foram separados dos tecidos moles aderentes, pesados e analisados.

Análise química: A análise química das rações quanto à Composição centesimal, seguiu a recomendação da AOAC (6).

O teor de zinco nas rações e material biológico foi determinado pelo método preconizado por Parker et al. (7), em espectrofotômetro de absorção atômica, após a digestão via úmida. Para o controle da análise, seguiu-se as recomendações de Cornelis (8), utilizando-se como material de referência a «Total Diet 1548» NBS (National Bureau of Standards).

As concentrações de vitamina A e carotenóides no plasma e fígado dos animais, foram determinadas pelo método proposto por Bessey & Lowry modificado por Flores (9).

Para a análise estatística, utilizou-se a metodologia de análise de variância e o teste de Tuckey com 5% de probabilidade (10).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A deficiência de zinco foi obtida oferecendo-se aos animais, no período da lactação, ração à base de caseína sem a adição de zinco na mistura salina e a caseína foi lavada com EDTA 1%. Segundo a literatura, o procedimento comum para a eliminação dos teores residuais de zinco, do produto, é a lavagem com EDTA 1%, que teria uma função quelante (5, 11). A concentração inicial e final de zinco na caseína utilizada em nosso estudo, foi respectivamente 21 µg/g e 3 µg/g, estando adequada aos propósitos do estudo. Não foi observada nenhuma manifestação de diarreia durante o período de estudo decorrente do resíduo de EDTA.

Quanto aos possíveis contaminantes do meio ambiente que eventualmente pudessem interferir na depleção de zinco, tentou-se minimizar através da desmineralização.

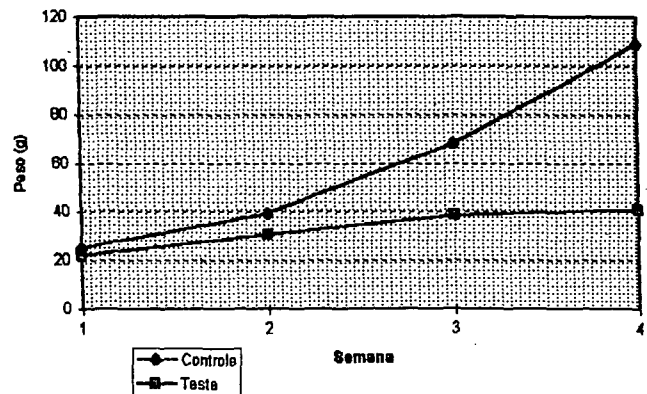
Em relação a vitamina A, apenas omitimos a adição na mistura vitamínica.

A deficiência de vitamina A é geralmente induzida em ratos após o desmame, através de uma ração semi-sintética deficiente em vitamina A ou pela incorporação adicional de ácido retinóico para acelerar a depleção das reservas (12, 13). Nessas condições o «plateau» da curva de crescimento e a redução de vitamina A no plasma, estágio de deficiência, ocorreria após 6 a 12 semanas (14, 15).

Ratas gestantes tem sido utilizadas como modelo para se obter animais deficientes em vitamina A por meio de ração isenta de vitamina A, contendo ácido retinóico ou suprimento restrito de retinol (16). Um modelo recentemente sugerido para a produção da deficiência de vitamina A em ratos após o desmame, foi a hepatectomia parcial (60%), visando a remoção das reservas em associação com uma ração deficiente em vitamina A (17). Neste estudo, foi desenvolvido um modelo experimental de deficiência de zinco e vitamina A a partir do nascimento, ou seja, com ratos pós-parto e seus respectivos filhotes, que receberam uma ração à base de caseína deficiente em zinco e vitamina A.

De acordo como os resultados obtidos, observou-se que na primeira semana de depleção não houve uma diferença significativa entre os pesos dos animais controle e teste, entretanto, a partir da segunda semana houve diferença extremamente significativa, Fig. 1.

FIG. 1
Evolução ponderal média dos filhotes do grupo controle e teste



O zinco é um nutriente essencial para o crescimento normal e desenvolvimento de muitas espécies (18), assim como a vitamina A (19).

É possível que os estoques de zinco dos ratos recém nascidos, e o leite rico em zinco no período da lactação, 13 a 17 µg/mL, (20) tenham interferido na evolução ponderal da primeira semana. Entretanto; ao final do experimento, observou-se uma redução significativa do peso dos animais do grupo teste em relação ao controle, refletindo uma redução da concentração de zinco no leite e conseqüentemente um suprimento inadequado, ocasionando a deficiência nos filhotes e nas ratas conforme os estudos de Mutch & Hurley (1).

Neste contexto, um outro fator adicional foi a deficiência concomitante de vitamina A. O zinco está envolvido na manutenção do transporte normal de vitamina A no plasma (21). Há sugestões de que a deficiência de zinco interfere com a síntese da proteína ligadora de retinol (RBP), resultando na incapacidade dos ratos deficientes em zinco em mobilizar

adequadamente a vitamina A do fígado (22).

De acordo com os estudos de Duncan & Hurley (3), a deficiência simultânea de zinco e vitamina A em ratos no período gestacional, produziu uma teratogenicidade maior do que se previa pelo efeito adicional da interação entre os nutrientes mencionados, fato que poderia ter interferido significativamente na depleção de zinco e vitamina A nos animais durante o período da lactação.

Uma das consequências importantes da deficiência de zinco é o seu efeito sobre o crescimento. Investigações sobre os mecanismos deste efeito são complicados em função da anorexia (23). Segundo Park et al (24), a quantidade limitada de zinco disponível em animais deficientes, é utilizada para as funções vitais do organismo em detrimento ao crescimento. Algumas explicações quanto às alterações no peso corporal em função da deficiência de zinco, estão nas taxas de síntese e degradação protéica, justificadas pela atividade reduzida da timidina kinase que portanto prejudicaria a síntese de DNA e divisão celular (18). Todas essas alterações repercutem no organismo principalmente em relação ao desenvolvimento, provocando sua redução ou parada que pode ser restabelecida com a suplementação de zinco (25).

Da mesma forma, estudos tem relatado que animais submetidos a uma ração deficiente de vitamina A, crescem até que quase toda reserva vitamínica seja consumida, interrompendo aí o crescimento, apresentando a seguir «um plateau» na curva de crescimento, seguido pela perda de peso e morte do animal (13).

Os resultados deste nosso estudo, mostraram ainda que o consumo de ração deficiente em zinco e vitamina A pelos animais, resultou em alterações importantes no estado nutricional. Somando-se ao retardo de crescimento, observou-se ao final do experimento, outros sinais como a anorexia, paralisia das patas dianteiras e traseiras, postura anormal e dermatite de pata susceptíveis ao sangramento. Para a avaliação da depleção de zinco, foi utilizada ainda, a concentração de zinco nos fêmures.

De acordo com a Tabela 3, ao final do período de depleção observou-se que houve uma redução significativa dos teores desde mineral nos fêmures dos animais do grupo teste, tanto nas ratas como nos filhotes. Isso pode representar uma alteração do estado nutricional decorrente da ingestão de ração deficiente, com conseqüente redução das reservas orgânicas (11)

Para a determinação da biodisponibilidade de zinco, os fêmures tem sido o parâmetro de escolha (26). Acredita-se que o zinco existente no osso, possa ser liberado durante os estados de deficiência para os locais onde a necessidade é mais crítica, inclusive para o crescimento (26). Atualmente, Zhou et al (27), sugerem a existência de dois «pools» de zinco, um de «turnover» rápido, onde o zinco pode ser facilmente removido quando necessário e como isso manter a homeostase sem uma redução substancial no crescimento, outro de «turnover» lento onde o zinco não pode ser utilizado sem a perda do osso. Portanto, quando os animais sofrem uma restrição marginal de

zinco, o primeiro «pool», contendo de 10 a 20% do zinco total, é facilmente utilizado para as necessidades dos tecidos moles, seguido pela redução da taxa de crescimento para a manutenção da homeostase de zinco.

TABELA 3
MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DOS TEORES DE ZINCO NOS FÊMURES, VITAMINA A NO PLASMA E FÍGADO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E TESTE AO FINAL DO PERÍODO DE DEPLEÇÃO

Parâmetros	Ratas		Filhotes	
	Controle	Teste	Controle	Teste
Zinco Fêmures (µg/g)	202,0±19,8 ^a	166,5±11,1 ^a	115,7±5,4 ^a	35,5±3,3 ^b
Vit. A fígado (µg/g)	111,8±4,4 ^a	194,5±3,7 ^a	22,6±2,1 ^a	26,4±5,8 ^a
Vit. A plasma (µg/dL)	43,31±3,4 ^a	26,8±4,4 ^b	31,5±2,5 ^a	8,9±3,4 ^a

* As mesmas letras no sentido horizontal não diferem entre si ao nível de $p < 0,05$ de probabilidade.

Entretanto, parece não existir reserva de zinco no organismo humano, e apenas uma pequena porção poderia estar disponível para ser redistribuída para prevenção dos sintomas de deficiência (28).

Em relação à concentração de zinco nos fêmures, os resultados sugerem que uma ração restrita em zinco, estaria comprometendo a biodisponibilidade do mesmo, principalmente no animal jovem onde as necessidades estão aumentadas.

No que se refere aos teores de vitamina A nos tecidos, Underwood et al (29), estudaram o efeito da depleção progressiva de vitamina A nas reservas hepáticas de retinol em ratos, e observaram que os níveis plasmáticos permaneciam normais enquanto as concentrações hepáticas não estivessem abaixo de 10 µg de retino/g de tecido. Outros achados semelhantes, sugerem que na inadequação de vitamina A na dieta, existe um mecanismo de compensação interna que mantêm os níveis plasmáticos, a partir de reservas endógenas, em uma concentração necessária para suprir os tecidos a um nível ideal, isto, enquanto houver uma quantidade razoável de vitamina A no fígado (30).

No presente estudo, com a depleção concomitante de zinco e vitamina A, de acordo com a Tabela 3, observa-se uma redução significativa de vitamina A no plasma dos filhotes do grupo teste. Ao contrário do que se verifica em estudos de depleção de vitamina A na lactação, não houve diferença significativa na concentração de vitamina A hepática dos filhotes. Os dados demonstram que embora não houvesse diferença significativa na concentração de vitamina A no fígado destes animais, a concentração de vitamina A no plasma foi bastante inferior nos animais deficientes, sugerindo

uma limitação maior do zinco, uma vez que a vitamina A não foi adequadamente mobilizada do fígado para o plasma. Quanto ao teor de vitamina A no fígado das ratas mães, houve maior concentração nos animais que receberam a ração deficiente em zinco e vitamina A em relação ao controle ($p < 0,05$). Comportamento inverso foi observado quanto a concentração de vitamina A no plasma, Tabela 3. Neste caso, os teores reduzidos de vitamina A no plasma em ratos deficientes em zinco e vitamina A, parece ser efeito específico da deficiência de zinco sobre a mobilização de vitamina A do fígado.

Portanto, estes resultados são consistentes com o propósito de que o zinco e a vitamina A interagem a nível de mobilização hepática (21) e estão em concordância com os resultados de Smith et al (30) e Duncan & Hurley, (3).

CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi desenvolvido e de acordo com os resultados obtidos, sugere-se que houve interação entre zinco e de vitamina A a nível de mobilização de vitamina A do fígado para o plasma e deficiência desses dois nutrientes no modelo experimental, embora no caso da vitamina A, a nível marginal.

REFERENCIAS

- Mutch P.B., Hurley L.S. Effect of zinc deficiency during lactation on postnatal growth and development of rats. *J. Nutr. Philadelphia* v. 104, p. 828-42, 1974.
- Davila M.E., Morris L., Cleary M.O., Row C. Vitamin A during lactation: relationship of material diet to milk vitamin A content and to the vitamin A status of lactating rats and their pups. *J. Nutr. Philadelphia*, v.115, n.8, p.1033-41, 1985.
- Duncan J.R., Hurley L.S. An interactions between zinc and vitamin A in pregnant and fetal rats. *J. Nutr. Philadelphia* v. 108, p.1431-38, 1978.
- Committee on laboratory animal diets/Assembly of Life Sciences National Research Council. Control of diets in laboratory animal experimentation. *Nutr. Abstr. Rev. Slough*, v. 49, p.413-19, 1979.
- Mazza R.P.D. Biodisponibilidade de zinco de diferentes fontes de suplementação em dieta regional de São Paulo. São Paulo, 155p. (Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP), 1992.
- Association Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14 ed. Arlington, 1141p. 1984.
- Parker M.M., Homeller F.L., Mahlen D.J. Determination of copper and zinc in biological material. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, v.13, p. 40-42, 1967.
- Cornelis R. Use of references materials in trace element analysis of foodstuffs. *Food Chem. Barking* v. 43, p.307-13, 1992.
- Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.F., López J.A. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J. Biol. Chem Baltimore*, v.166, p.177-79. 1946.
- Pimentel Gomes F. Curso de estatística experimental. 12 ed. Piracicaba, 467p. 1987.
- Swenerton H., Hurley L.S. Severe zinc deficiency in male and female rats. *J. Nutr. Philadelphia* v.95,p. 8-18, 1968.
- Dowling J.E., Wald G. The biological function of vit. A acid. *Proc. Nat. Acad. Sc. US.* v.46, p.587-608, 1960.
- Lamb A.J., Apiwatanaporn P., Olson J.A. Induction of rapid synchronous vitamin A deficiency in the rat. *J.Nutr. Philadelphia*, v.1005, p.1140-48. 1974.
- John A., Sivakumar B. Effect of vitamin A deficiency on nitrogen balance and hepatic urea cycle enzymes and intermediates in rats. *J. Nutr. Philadelphia*, v.119, p.29-35, 1989.
- Ravi Kumar K., Das A. Effect of vitamin A deficiency on urinary calculus formation in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* v.8, p.51-60, 1990.
- Rogers W.E., Bieri J.G. Vitamin A deficiency in the rat prior to weaning. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v.132, p.622-24. 1969.
- Sivakumar B., Panth M. A new model for producing vitamin A deficiency in rats. *Internat J. Vit. Nutr. Res.* v.63, p.56-62, 1993.
- Underwood E.J. Trace elements in human and animal nutrition. 4^{ed}. New York, Academic Press, p.196-233. 1977.
- Takahashi Y.I., Smith J.E., Winick M. Goodman D.S. Vitamin A deficiency and fetal growth and development in the rat. *J. Nutr. Philadelphia*, v.105, p.1299-1310, 1975.
- Hurley L.S., Muth P.B. Prenatal and postnatal development after transitory gestational zinc deficiency in rats. *J. Nutr. Philadelphia*, v. 105, p. 649-56, 1973.
- Smith J.C. Jr., McDaniel E.G., Fan F.F., Halsted J.A. Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism. *Science, Washington*, v. 181, p.954-55, 1973.
- Smith J.E., Brown E.D., Smith J.C. The effect of zinc deficiency on the metabolism of retinol-binding protein in the rat. *J. Lab. Clin. Med. St. Louis*, v.84, p.692-977, 1974.
- Chester J.K., Quatterman J. Effects of zinc deficiency on food intake and feeding patterns of rats. *Br. J. Nutr.*, London, v. 24, p.1061-69, 1970.
- Park J.H.Y., Grandjean C.J., Antonson D.L., Vanderhoop J.A. Effects of isolated zinc deficiency on the composition of skeletal muscle, liver and bone during growth in rat. *J. Nutr. Philadelphia*, v. 116, p.610-17, 1986.
- Prasad A.S. Experimental zinc deficiency in humans. In: Inglett G.E. ed. Nutritional bioavailability of zinc. *Am Chem Soc. Washington*, p.1-14, 1983.
- Moncilovic B., Belonje B., Giroux A., Shah B.G. Total femur zinc as the parameter of choice for a zinc bioassay in rats. *Nutr. Rep. Int. Los Altos*, v.12, n.3, p.197-203, 1975a.
- Zhou J.R., Canar M.M., Erdamn J.W. Jr. Bone zinc is poorly released in young growing rats fed marginally zinc restricted diet. *J. Nutr. Philadelphia*, v.123, p.1383-88, 1983.
- Jackson M.J., Lowe N.M. Physiology role of zinc. *Food Chem, London*, v. 43, p.233-38, 1992.
- Underwood B.A., Loerch J.D., Lewis K.C. Effects of dietary vitamin A deficiency retinoic acid and protein quantity and quality on serially obtained plasma and liver levels of vitamin A in rats. *J. Nutr. Philadelphia*, v.109, p.796-806, 1979.
- Smith J.C., Brown E.D., McDaniel E.G., Chen W. Alterations in vitamin A metabolism during zinc deficiency and food and growth restriction. *J. Nutr. Philadelphia*, v.106, p.569-74, 19776.

Recibido: 17-11-1994

Aceptado: 04-10-1995

Extraction, purification and some partial characterization of α -amylase inhibitors from wheat Iapar 28-Igapó

Neide Kiyoko Kondo ¹, Elza Iouko Ida ²

Universidade Estadual de Londrina. Brasil

SUMMARY. α -Amylase inhibitors from wheat (*Triticum aestivum*) cultivar Iapar 28-Igapó were extracted with water in a 1:10 (w:v) ratio and precipitated with ammonium sulfate between 20-50% saturation, followed by DEAE and CM-cellulose chromatography. One inhibitor was purified and designated as CMC-IB, and had electrophoretic mobilities of 0.23 and 0.54 in alkaline and acidic conditions, respectively. This inhibitor was 750 times more active on human salivary α -amylase (HSA) than porcine pancreatic α -amylase (PPA). The preincubation time required for maximum complexation with HSA was 20 minutes and optimum pH of inhibition was 7.5. The inhibitor CMC-IB was stable at 0°C and maintained 50% of inhibitory activity against HSA, when incubated at 98°C for one hour.

RESUMEN. Extracción, purificación y algunas características parciales de los inhibidores de α -amilasa del trigo 28-Igapó. Los inhibidores de α -amilasa del trigo (*Triticum aestivum*) Iapar 28-Igapó fueron extraídos con agua en la proporción de 1:10 (p/v) precipitado como sulfato de amonio entre 20-50% de saturación, en seguida fue realizada una cromatografía en DEAE y CM-celulosa. Un inhibidor fue purificado e identificado como CMC-IB y su movilidad electroforética fue de 0,23 y 0,54 en medio alcalino y ácido, respectivamente. Este inhibidor fue 750 veces más activo en α -amilasa humana que la α -amilasa pancreática de puerco (APP). El tiempo de preincubación para la complejación máxima con ASH fue de 20 minutos y el pH óptimo de inhibición fue de 7,5. El inhibidor CMC-IB fue estable a 0°C y mantuvo 50 % de su actividad inhibidora contra ASH, cuando fue incubado a 98°C durante una hora.

INTRODUCTION

Proteinaceous inhibitors of α -amylase (1,4-alpha D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) have been the subject of extensive investigation, based on reasons such as: (a) the possible interference of these compounds with starch digestion in live organisms (1,2); (b) lack of knowledge about their physiological function (3,4); (c) possible undesirable effects related to tooth decay in children (5); (d) potential for utilization as therapeutic agents (6); (2) analytical application in purification of α -amylase from different origin (7) and (f) in selection and genetic improvement of varieties of wheat more resistant to insect attack during storage (8).

These inhibitors are widely distributed in plants and most inhibit the human saliva (HSA) and porcine pancreatic α -

amylases (PPA). The literature describes also the inhibition of α -amylases obtained from fungi and bacteria (9-14); insects (15, 16); marine animals and plants other than those from which the inhibitors were isolated (17). On the other hand, there are descriptions of inhibitors that inhibit their own α -amylases. These are designated as endogenous inhibitors and these have been isolated from wheat (4), barley, triticale, rye (8) and corn (18).

Purification to homogeneity of these protein inhibitors from wheat was done by conventional techniques such as ion exchange and/or gel filtration chromatography (12, 14, 19, 20, 21, 22).

Silano et al (9) confirmed the presence of six albumin inhibitors of α -amylase from wheat, codified as '0.19; 0.28; 0.32; 0.35, 0.39 and 0.48', according to relative electrophoretic mobilities. The 0.19 inhibitor inhibited only HSA, while the inhibitors of the '0.28 family' (0.28-0.48) did not inhibit HSA, but inhibited the α -amylases from insects. O'Donnell and McGeeney (19) separated one homogeneous fraction from wheat inhibitor (designated as '0.20'), that was 600 times

1 Professora assistente do Depto. de Química

2 Professora adjunto do Depto. de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos.

more active for HSA inhibition than for PPA. Another albumin inhibitor from wheat (codified as '0.53') was purified and described as belonging to '0.19 family' with inhibition specificity against HSA.

α -amylase inhibitor of gliadinic nature also have been described in wheat, which was extracted with 70% ethanol and purified to homogeneity (12). Three wheat α -amylase inhibitors, designated as 0.19; 0.28 and 0.55 (electrophoresis mobility), exhibited different inhibition characteristics against HSA.

The levels and specific activities inhibition of aqueous extract of 28 wheat cultivars recommended in Paraná State (Brazil) against HSA and PPA were determined and clustered. The wheat Iapar 28-Igapó showed higher specific activity inhibition against HSA (23) and was selected for this study.

The α -amylase inhibitor from wheat in Brazil has never been studied, and in this paper we describe the extraction, purification and partial characterization of α -amylases inhibitors from wheat Iapar 28-Igapó.

MATERIAL AND METHODS

Materials: The wheat (*Triticum aestivum*) cultivar Iapar 28-Igapó was furnished by Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR)-Londrina-PR. Human saliva α -amylase (HSA) crude extract was prepared from saliva collected from individuals in the laboratory. The pooled material was centrifuged at 4°C/7000 g for 30 minutes and the supernatant partially fractionated with 0-50% saturated acetone. After centrifugation, the supernatant was fractionated by saturation with 70% (25). The precipitate obtained was suspended with 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.9, added to 38 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, and 0.02% sodium azide. This enzyme crude extract was frozen and stocked for further use. Porcine pancreatic α -amylase (PPA) of IA type, two times crystalized was acquired from Sigma. The ion exchange resins were DEAE-cellulose and CM-cellulose from Sigma. Other materials and reagents were of analytical grade.

Methods: Grinding of a grain. The wheat flour was obtained by grinding in a mill of hammer type, without heating the flour and equipment.

Substrate preparation: Five percent maize starch solution was reduced with sodium borohydride and stocked at 4°C, according to Strumeyer (24). Aliquots from this solution were neutralized daily and diluted to 1% with the same buffer used for suspension of the HSA.

Determination of the enzyme activity of α -amylases: HSA and PPA activities were determined following the method of Bernfeld (25). Suitable amounts of the adequately diluted enzyme were preincubated in the buffer for 20 minutes at 37°C and added to 1.0 ml of 1% solution of reduced starch. After

incubation of 5 minutes, the reaction was terminated by the addition of 2.0 ml of 3,5 dinitrosalisilic acid (DNS) reagent in the alkaline medium. Simultaneously, a blank without enzyme was prepared. The tubes were heated at 100 °C for 5 minutes and immediately cooled in tap water. Each tube was distilled with 5 ml of the destilated water and the amylase activity was determined by absorbance read at 540 nm. One unit of α -amylase activity (1 UA) corresponded to production of one micromol of maltose per minute at 37 °C, in 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 containing 38 mM NaCl and 0.1 mM CaCl₂.

Determination of the activity of the α -amylase inhibitor:

The inhibitory activity on HSA and PPA was determined by incubating 100 μ l of the adequately diluted inhibitor with 100 μ l of enzyme solution and the volume completed to 1.0 ml with the same buffer used for amylase activity determination. The procedure was followed as described previously. Simultaneously, a blank without inhibitor and enzyme, and a control without inhibitor were prepared. The control served as a parameter for inhibition percentage calculation. It was considered that the control had 100% α -amylase activity. The results were expressed in α -amylase inhibitor units (AIU), considering that 1 AIU was equivalent to 50% α -amylase inhibition under assay condition. The inhibitory specific activity was defined as the ratio between the total inhibitory activity and the total protein. The relation between HSA and PPA inhibitory activity was referred to as HSAIU/PPAIU.

Protein determination: The amount of soluble protein, in all the steps of this study, was quantified by the method of Lowry et al. (26). Bovine serum albumin was used as standard. The protein concentration in the eluted fractions during chromatography was estimated by absorbance at 280 nm.

Extraction and fractionation of α -amylase inhibitors: The extraction of the α -amylase inhibitors from Iapar 28-Igapó wheat was accomplished with water and 200 g of the meal in a 1:10 (w/v) ratio, with constant stirring for one hour at room temperature. During fractionation of the inhibitors, the precipitate obtained from 0-20% saturation of ammonium sulfate was discarded and the supernatant submitted to fractionation with 50% saturation of ammonium sulfate. This solution was left overnight at 4 °C. Afterwards, it was centrifuged and the precipitate P20-50 suspended with 5 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 and dialysed against the same buffer for 48 hours at 4 °C.

Purification of α -amylase inhibitors: Six hundred mg of the P20-50 protein extract was applied in the DEAE-cellulose anion exchange column which had been previously treated and equilibrated with 5 mM sodium phosphate buffer pH 6.9. In the next step, the same buffer with 20 mM Na₂HPO₄ was used, followed by 20 mM Na₂HPO₄ with 0.5 M NaCl,

maintaining the same pH. Four ml fractions were collected in the tubes using an automatic collector (LKB 2070). The protein concentration in each fraction was monitored at 280 nm and the inhibitory activity against HSA and PPA was also determined. The fractions presenting the higher inhibitory activity against HSA were pooled and concentrated. The pooled fractions DEAE-I and DEAE-II were concentrated with a molecular filter of immersion type with 10,000 exclusion limit. The pooled and concentrated fractions from DEAE-I and DEAE-II were applied to the CM-cellulose cation exchange columns equilibrated with 0.1 M sodium acetate buffer pH 4.8. Initially, the fractions were eluted with equilibrium buffer and followed by linear gradient concentration (0.1-0.5 M) of acetate buffer pH 4.8. The protein concentration in the tubes was read at 280 nm and the activity against HSA and PPA was determined. The fractions with inhibitory activity against HSA and PPA were combined and frozen for characterisation studies.

Electrophoretical studies of inhibitory fractions: Gel electrophoresis of amylase inhibitors under nondissociating conditions were performed using 7% acrylamide gels with 0.025 M tris-glycine, pH 8.3, as the running buffer. The gels were loaded with 50-100 µg protein and stained with comassie brilliant blue R-250 according to the method of Davis (27). The electrophoresis in acidic medium (pH 4.3) was conducted as described by Reisfeld et al (28).

Effect of preincubation time on HSA inhibition by CMC-IB: Inhibitor CMC-IB was diluted in water and preincubated with 100 µl of HSA at 37 °C in a volume of 1.0 ml with 10 mM phosphate buffer containing 38 mM of NaCl and 0.1 mM of CaCl₂. After intervals of time, varying from zero to 80 minutes the residual activity toward HSA was determined according to the procedure previously described.

Effect of pH on CMC-IB interaction with HSA: The inhibitor CMC-IB was diluted in distilled water and equilibrated in different pHs using the following buffers solution: 20 mM sodium acetate (pH 4.0 to 5.5), 20 mM sodium phosphate (pH 6.1 to 7.9), 20 mM tris-HCL (pH 7.4 to 8.8) and a 0.04 M tris solution (pH 10.0). Following, the inhibitory activity was determined throughout the incubation of 100 µl of each solution containing the inhibitor in different pHs with 100 µl of enzyme solution. After 20 minutes of preincubation, 1.8 ml of reduced starch solution (24) was added in tubes. The further steps were done according with process previously described.

Thermal stability of inhibitor CMC-IB: The thermal stability of the purified inhibitor CMC-IB was conducted at temperatures of 0°, 23°, 37° and 98 °C over a range time. The residual inhibitory activity was then tested against HSA as previously described.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction, fractionation and purification of α -amylase inhibitors from Wheat Iapar 28-Igapó.

Results from different phases of separation and purification of the α -amylase inhibitors against HSA and PPA are presented in Table 1. Fractions P20-50 resulted in a yield of 74.35% and 31.12% in the inhibitory activity against HSA and PPA, respectively. In this step, the purification increased by 2.83 times for HSA and 1.18 times for PPA in relation to crude extract. The relation between HSAIU and PPAIU demonstrated that the inhibitory activities in the crude extract and P20-50 were respectively of about 4.0 and 10.0 times more active against HSA than the PPA.

TABLE 1
SEPARATION AND PURIFICATION OF AMYLASE INHIBITORS FROM WHEAT IAPAR-28 IGAPO

	Crude extract	P20-50	DEAE-I	DEAE-II	DEAE-III	CMC-IB	CMC-II
Vol. (ml)	1,565	34	120	80	40	80	17,5
Total units (HSA IUx10 ³)	3,461.78	2,573.83	1,952.46	57,83	25,86	1,094.74	16.10
Total protein (mg)	3,317.80	872.10	272.09	24.88	48.84	76.74	5.57
Specific activity (HSA IU x 10 ³ /mg)	1,043.40	2,951.30	7,175.79	2,324.36	429.48	14,265.57	2,890.48
Purification times	1	2.8	6.9	2.2	0.51	13.7	2.8
Yield ¹ (%)	100	74.35	56.40	1.67	0.75	31.62	0.47
Total units (PPA IU x 10 ³)	839.07	61.15	2.23	11.76	5.68	1.46	0.57
Specific activity (PPA IU x 10 ³ /mg)	252.90	299.45	8.20	472.67	116.29	19.02	102.33
Ratio HSA IU/PPA IU	4.13	9.85	875.54	4.92	4.55	749.82	28.25
Purification times	1	1.2	0	1.9	0.5	0.1	0.4
Yield ² (%)	100	31.12	0.27	1.40	0.68	0.17	0.07

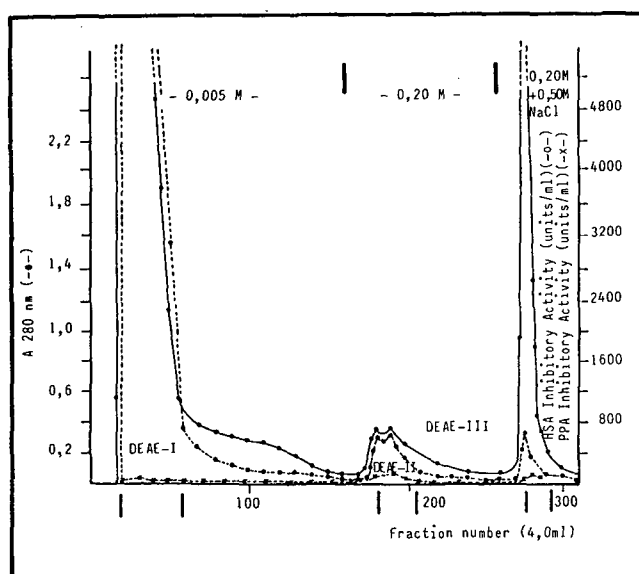
1 For total inhibitory activity against HSA

2 For total inhibitory activity against PPA

The chromatography in DEAE-cellulose of the fraction P20-50 separated three protein peaks and was designated DEAE-I, DEAE-II and DEAE-III, according to the elution order (Figure 1). The elution system of this chromatography was similar to that used by Granum & Whitaker (12) for the purification of α -amylase inhibitors from wheat.

FIGURE 1

Chromatography on DEAE-cellulose from wheat flour extract P20-50 of wheat flour. Elution with phosphate buffer pH 6,9 in different concentration: 5 mM, 20 mM and 20 mM with 0.5 M NaCl. The pool fraction are indicated with bars.



Data in Figure 1 and Table 1, show that the DEAE-I fraction had higher protein concentration than other fractions and elevated inhibition activity against HSA, but low inhibition against PPA.

Related to the HSA inhibition (Table 1), greater yield was observed in the DEAE-I fraction containing 56.40% in relation to initial crude extract. A low yield was obtained for the DEAE-II and DEAE-III fractions, with values of 1.67% and 0.75%, respectively. Granum and Whitaker (12) obtained two major peaks (I and II) with inhibitory activities against HSA, but they did not mention the quantitative inhibition against HSA for these peaks.

The DEAE-I fraction presented low total inhibitory activity against PPA (2.23×10^3 PPAIU), while the DEAE-II and DEAE-III fraction presented higher inhibition values 11.76×10^3 and 5.68×10^3 PPAIU, respectively.

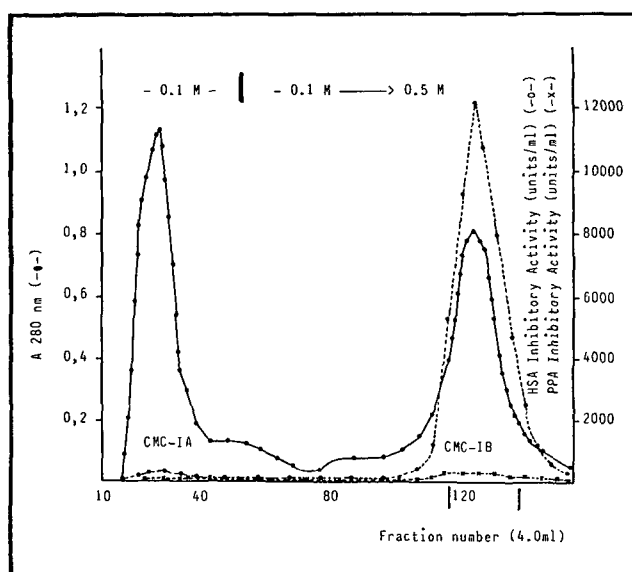
The relation ship between HSAIU and PPAIU (Table 1) for the DEAE-I, DEAE-II and DEAE-III fractions was 875.5, 4.9 and 4.6 respectively.

The DEAE-I fraction with high inhibitory activity against HSA was chromatographed by CM-cellulose as described by

Granum and Whitaker (12). In this chromatography system (Figure 2), two protein fractions were separated and designed CMC-IA and CMC-IB. The CMC-IA fraction presented low activity against HSA and PPA, while the CMC-IB fractions presented high inhibitory activity against HSA. The total protein of the CMC-IB fraction was 76.74%, the total inhibitory activity against HSA yield was 31.62% and the purification was 13.67 times that of initial crude extract. The specific inhibitory activity against HSA from this fraction was twice that of the DEAE-I fraction. This CMC-IB fraction was characterized by its high inhibition coefficient against HSA (Table 1 and Figure 2). The fraction I from DEAE-cellulose, described by Granum and Whitaker (12), after chromatography in CM-cellulose, resolved in three protein groups; the first and second (designated 0.28) did not present activity against HSA and the third (designated 0.19) presented inhibitory activity against HSA and PPA. Additional investigation is necessary for the confirmation of these possible differences.

FIGURE 2

Chromatography on CM-cellulose from pooled fractions of DEAE-I. Elution with sodium acetate buffer pH 4.8 - 0.1 M and linear gradient concentration (0.1 - 0.5M). The pooled fractions are indicated with bars.



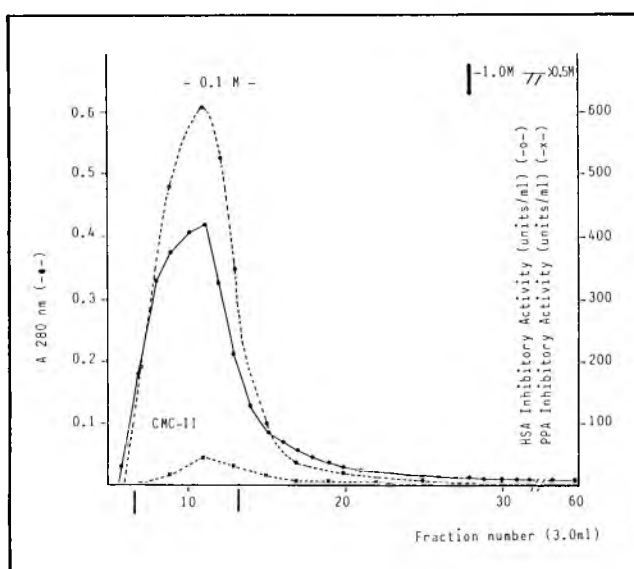
The ratio between HSAIU and PPAIU showed that the inhibitory activity in the CMC-IB was 749.82 times more active against HSA than PPA, confirming that the inhibition activity of CMC-IB was more specific against HSA. O'Donnell and McGeeney (19) purified until homogeneity one albumin inhibitor from wheat, codified 0.20, that was 600 times more active against HSA than PPA. On the basis of the high specificity of inhibition of α -amylase inhibitors from wheat against HSA, O'Donnell et al (29) suggested the utilization of these inhibitors for analytical purpose, in the differentiation of

human salivary and pancreatic amylases.

The DEAE-II fraction with low inhibition yield against HSA and PPA was applied in another CM-cellulose column using the same system of elution. In this system, only one inhibitory fraction (designated as CMC-II) against HSA and PPA was observed after elution with equilibrium buffer (Figure 3). The linear gradient concentration which followed did not produce further protein fractions. Granum and Whitaker (12) also observed that the fraction II of DEAE-cellulose which had separated initially in a fraction designated 0.55, did not produce any further inhibitory fractions.

FIGURE 3

Chromatography on CM-cellulose from pooled fractions of DEAE-II. Elution with sodium acetate buffer pH 4.8 - 0.1 M and linear gradient concentration (0.1 - 0.5 M). The pooled fractions are indicated with bars.



Electrophoretical studies of the inhibitory fractions:

Next, the purification steps were accompanied by electrophoresis study in PPA gel (pH 8.3) of crude extract, P20-50, DEAE-a, DEAE-II, DEAE-III, the result of which are presented in the Figure 4. In this electrophoresis study, the DEAE-I fraction showed to have a strong inhibitory against HSA. For this reason this fraction CM-cellulose chromatography.

The fraction, of the CM-cellulose chromatography (designated CMC-IB) presented one unique band in the alkaline (pH 8.3) and acidic (pH 4.3) electrophoresis, with electrophoretal mobility of 0.23 and 0.54 respectively (Figure 5). This mobility was similar to α -amylase inhibitors from wheat with mobility of 0.20 (In 1) and 0.21 (In 2) (14). Bedetti et al. (30) separated α -amylase inhibitors from wheat with different electrophoretal mobilities, and one them presented mobility of 0.23 and was active against HSA and *Tenebrio molitor* amylase.

The electrophoresis of the CMC-II fraction (Figure 5) indicated the presence of a protein band with electrophoretal mobility of 0.62 (pH 8.3) and 0.41 (pH 4.3). In this electrophoresis it was possible to observe the presence of other protein bands of low colouration intensity. The fraction CMC-II, although having a low inhibitory activity against HSA and PPA, was studied in an attempt to compare with other α -amylase inhibitor from wheat described in the literature. The electrophoretal mobility of 0.62 in the alkaline medium for the wheat α -amylase inhibitors was equivalent to 0.64 as described by Bedetti et al (30).

FIGURE 4

Electrophoresis in PAA gel (pH 8.3) of crude extract (100 μ g); P 20-50 (50 μ g); DEAE-I (50 μ g); DEAE-II (100 μ g) and DEAE-III (100 μ g)

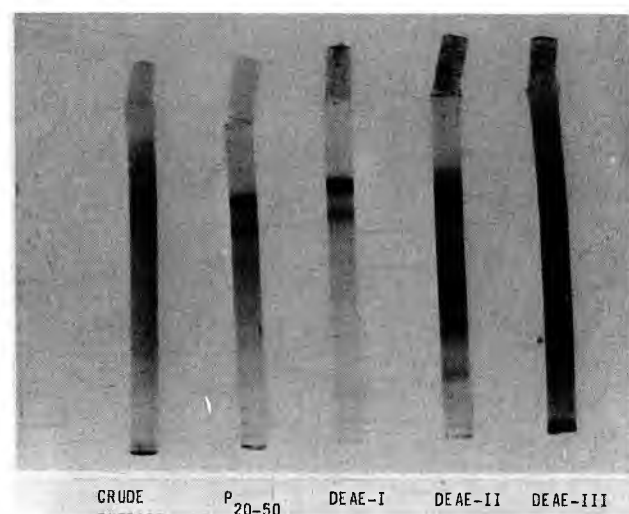
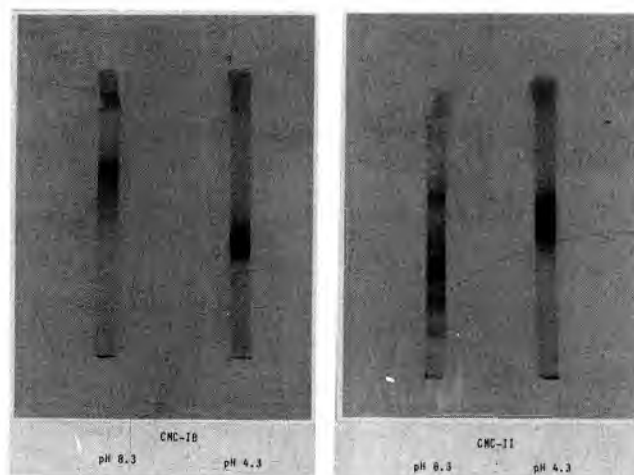


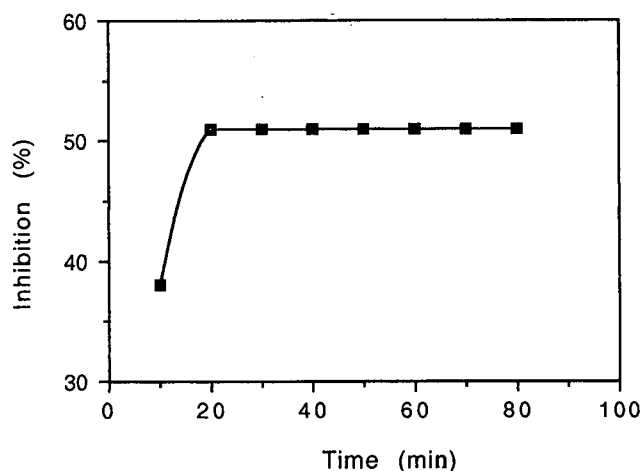
FIGURE 5

Electrophoresis in PAA gel in pH 8.3 and pH 4.3 of fractions CMC-IB and CMC-II



Effect of preincubation time of inhibitor CMC-IB with HSA: The preincubation time of inhibitor CMC-IB with HSA necessary for maximum inhibition was 20 minutes or more at 37°C (Figure 6). The literature indicates that the preincubation time for maximum inhibition against HSA depends on the inhibitors from different plants. The preincubation time necessary for the α -amylase inhibitors from wheat was 30 minutes (12, 14, 19, 21, 30, 31). However, for the triticale, the preincubation time was 45 minutes (32), and for bean, there are reports with 20 (11), 30 (10) and 45 minutes (33).

FIGURE 6
Effect of preincubation time of inhibitor CMC-IB and HSA at 37°C.



Effect of pH in the interaction of inhibitor CMC-IB with HSA: According to Figure 7, the optimal pH for HSA inhibition of inhibitor CMC-IB was pH 7.5. O'Donnell & McGeeney (19) observed a broad pH optimum from 6.4 to 8.0 for the interaction of wheat α -amylase inhibitors with HSA. Shaikin & Birk (21) related pH 7.0 as optimal inhibition pH to the wheat inhibitors Am1 and Am2 HSA and PPA, while for the inhibitor 0.19, the optimal pH observed was 8.0 (12).

Thermal stability of inhibitor CMC-IB: Figure 8, shows that at 0 °C, the inhibitor CMC-IB maintained its activity completely. At 23 °C there was gradual loss of inhibition for two hours and, after this period, the loss was less drastic. At 37 °C, about 80% of its inhibitory activity was maintained after one hour inhibition. Under the same conditions, O'Connor & McGeeney (14) previously showed that the inhibitors In1, In2 and In3 were slightly inactivated. At 98 °C for five minutes the inhibitor CMC-IB lost about 18% of activity and, under the same conditions, the inhibitor 0,19 lost about 80% of its activity (31), while inhibitor AmI2 described by Shaikin & Birk (21) was thermoresistant. After one hour incubation at 98 °C, the inhibitor CMC-IB lost about 50% of its activity, while inhibitors In2, In3 and In4 were completely inactive at the same conditions (14).

FIGURE 7
Effect of pH in the interaction of inhibitor CMC-IB with HSA. Buffer 20 mM sodium acetate pH 4.0 - 5.5; 20 mM sodium phosphate pH 6.1 - 7.9; 20 mM tris - HCl pH 7.4 - 8.8 and 0.04 M tris pH 10.0

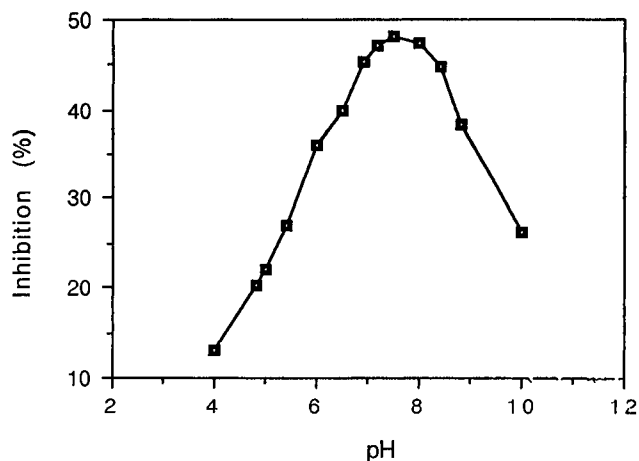
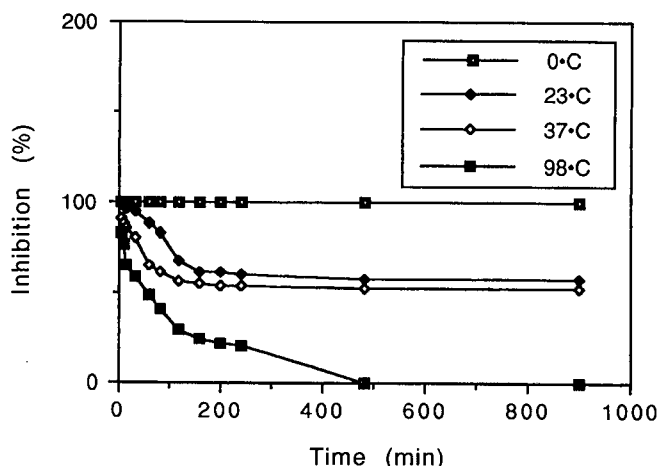


FIGURE 8
Thermal stability of alpha-amylase inhibitors CMC-IB at 0°, 23° and 98° C



ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CNPq (Proc. 403861/87.0), International Foundation for Science-Sweden (IFS E/1288-1), and to CPG/UEL for the grants received and Kondo, N.K. would like to thank CNPq for her scholarship.

REFERENCES

- Jaffé W.G. & Lette L.V. Heat-labile growth-inhibiting factors in bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Nutr 94:203-210. 1968.
- Savaiano D.A., Powers J.R., Costello M.J. The effect of an α -amylase inhibitor on the growth of weaning rats. Nutr Rep. Inter,

- 15(4):443-447, 1977.
3. Warchalewski J.R. Preliminary investigation on purification of native α -amylase inhibitors from Durum Wheat. *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences*, 24(10):559-563, 1976.
 4. Warchalewski J.R. Isolation and purification of native α -amylase inhibitors from winter wheat. *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences*, 25 (11):725-729, 1977.
 5. Udupa S.L., Prabakar A.R. & Tandon S. α -amylase inhibitors in foodstuffs. *Food Chemistry*, 34:95-101, 1989.
 6. Silano V. & Zahnley J.C. Association of *Tenebrio molitor* L α -amylase with two protein inhibitors on monomeric, one dimeric from wheat flour. *Biochem Biophys. Acta* 533:181-185, 1978.
 7. Buonocore V. & Poerio E. Affinity column purification of amylases on protein inhibitors from wheat kernel. *J Chromatog* 114:109-114, 1975.
 8. Yetter M.A., Sauders R.M. & Boles H.P. α -amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects. *Cereal Chem.* 56(4):243-244, 1979.
 9. Silano V., Pochiari F., Kasarda D.D. Physical characterization of α -amylase inhibitors from wheat. *Biochem Biophys. Acta*, 317:139-148, 1973.
 10. Powers J.R. & Whitaker J.R. Purification and some physical and chemical properties of fed kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor. *J. Food Biochem*, 1:217-238, 1977.
 11. Marshall JJ & Lauda C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean. *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol Chem.* 250(20): 8030-8037, 1975.
 12. Granum P.E. & Whitaker J.R. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor in wheat (*Triticum aestivum* var. Anza) *J. Food Biochem.* 9:235-249, 1977
 13. Granum P.E. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from rye (*Secale cereale*) flour. *J. Food Biochem.* 2:103-20, 1978.
 14. O'Connor C.M. & McGeeney K.F. Isolation and characterization of flour inhibitor from wheat with display differential inhibition specificities for human salivary and human pancreatic α -amylase. *Biochem. Biophys. Acta*, 658:387-396, 1981.
 15. Deponte R., Parlamenti R., Petrucci T., Silano V., Tomasei M. Albumin α -amylase inhibitor families from wheat flour. *Cereal Chem.*, 53(5):805-820, 1976.
 16. Buonocore V., Gramenzi F., Pace W., et al. Interaction of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors with α -amylase from yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L) larva. *Biochem J.*, 187:637-645, 1980.
 17. Silano V., Furia M., Gianfreda L., Macri A., Palesscadolo R., Raba A., Scardi V., Stella E., Vafre F. Inhibition of amylase from different origins by albumins from the wheat kernel. *Biochem Biophys Acta*, 391:170-178, 1975
 18. Blanco-Labra A. & Iturbe-Chifas F.A. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea miz*). *J. Food Biochem.* 5:1-17, 1981.
 19. O'Donell M.D. & McGeeney K.F. Purification and properties of an α -amylase inhibitor from wheat. *Biochem Biophys Acta.* 422:159, 1976.
 20. Petrucci T., Sannia G., Parlamenti R., Silano V. Structural studies of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors of α -amylase. *Biochem J.* 173:229-235, 1978.
 21. Shainkin R. & Birk Y. α -amylase inhibitor from wheat isolation and characterization. *Biochem Biophys Acta*, 221:502-513, 1970.
 22. Saunders R.M. & Lang J.A. α -amylase inhibitor in *Triticum aestivum*: purification and physical chemical properties. *Phytochem*, 12:1237-1241, 1973.
 23. Kondo N.K. & Ida E.I. Niveis e atividades específicas dos inibidores de α -amilases de cultivares de trigo recomendados no Paraná. *Arq. Biol. Tecnol*, 36(1):37-50, 1993.
 24. Strumeyer D.J. A modified starch for use in amylase assay. *Anal Biochem*, 19:61-71, 1967.
 25. Bernfeld P. Amylases α and β . *Meth Enzymol*, 1:149-154, 1955.
 26. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* 193:265-275, 1951.
 27. Davis B.J. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 121:404-27, 1964.
 28. Reisfeld R.A., Lewis U.J., Williams D.E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. *Nature*, 195:218-283, 1962.
 29. O'Donnell M.D., Fitzgerald O., McGeeney K.F. Differential serum amylase determination by use of an inhibitor and design of a routine procedure. *Clin Chem.* 23:560-566, 1977.
 30. Bedetti C., Bozzini A., Silano V. et al. Amylase protein inhibitors and the role of *Aeolops species* in polyploid wheat speciation. *Biochem Biophys Acta*, 362:299-307, 1974.
 31. Petrucci T., Rab A., Tomasi M, et al. Further characterization studies of the α -amylase protein inhibitor of gel electrophoretic mobility 0,19 from the wheat kernel. *Biochem Biophys Acta*, 420(2):288-297, 1976.
 32. Ida E.I., Finardi Filho F. & Lajolo F.M. Properties of two α -amylase inhibitors from triticale (*Triticum x secale*). *J. Food Biochem* (submitted for publication), 1993.
 33. Iguti A.M. & Lajolo F.M. Occurrence and purification of α -amylase isoinhibitors in bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties. *J. Agric Food Chem.* 39:2131-2136, 1991.

Recibido: 25-07-1994

Aceptado: 07-09-1995

Control de la actividad proteolítica en ensilado de pescado

Tomé Elisabetta¹, Levy Benshimol Abraham², Bello Rafael Antonio³

Universidad Central de Venezuela

RESUMEN. Se elaboró un ensilado microbiano a partir de una mezcla de pescados de bajo valor comercial y la adición de 15% de melaza, almacenándolo a 35° C. Se realizaron experiencias para observar el efecto de la adición de una preparación comercial de bromelina (0,20-0,90%) sobre el proceso de obtención del ensilado. Estas concentraciones fueron calculadas en base a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas en este trabajo. La licuefacción del ensilado se evaluó por medio de determinaciones de consistencia (cm recorridos en 30 s) y de nitrógeno no proteico. Los resultados indican que la adición de bromelina (0,7% ó más) acorta considerablemente el tiempo de licuefacción del producto obteniéndose la mayor actividad proteolítica en las primeras 3 horas de almacenamiento. Tales ensilados alcanzaron su licuefacción máxima en 12 horas en comparación con ensilados a los que no se les adicionó bromelina los cuales se licuaron en 15 días. Por lo tanto, se recomienda la inclusión de la preparación de bromelina comercial para la obtención de los ensilados.

SUMMARY. Proteolytic activity control in fish silage. Microbial fish silage was produced from grinded low commercial fish species added with 15% molasses and stored at 35°C. Experiment were conducted to evaluate the effect of the addition of a commercial preparation of bromelina (0.20-0.90%) to the fish silage. Liquefaction was evaluated measuring both the product consistency and its non protein nitrogen content. Results indicate that bromelina addition (0.7 or higher), increases dramatically the rate of proteolysis and decreases the time required for liquefaction from 15 days (no enzyme control) to only 12 hours. Therefore, the use of the commercial preparation of bromelina is highly recommended for silage production.

INTRODUCCION

El ensilado microbiano de pescado puede definirse como un producto líquido obtenido por fermentación bacteriana, en el cual el pescado molido se mezcla con una fuente de carbohidratos y un cultivo microbiano, que produce el ácido requerido para la preservación del producto.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se utilizó la fauna de acompañamiento del camarón, con 15% de melaza y 1% de *Lactobacillus plantarum*, para elaborar ensilados a 30 ± 2°C en anaerobiosis, tardándose 15 días en obtener un

producto estable y de adecuadas características sensoriales. Los ensilados fueron evaluados nutricionalmente alimentando pollos y cerdos con resultados satisfactorios (1,2).

Ensilados elaborados a partir de pescados enteros de bajo valor comercial con 15% de melaza y 1% de inóculo y almacenados a diferentes temperaturas alcanzaron valores de pH inferiores a 4,5 en 24 horas cuando se les adicionó desechos de frutas (papaya y piña) (3). Así mismo, la adición de estos desechos mejoró la eficiencia del proceso, puesto que incrementaba notablemente la licuefacción del ensilado. Esta mejora se ha atribuido a la presencia de enzimas proteolíticas (bromelina y papaína) en los desechos de piña y lechosa.

Las características bioquímicas del ensilado lo convierten en una materia prima factible de ser utilizada para la alimentación animal. Así, la inclusión de un ensilado de pescado elaborado por vía microbiana con desechos de papaya y piña, a un nivel del 15% en dietas para gallinas ponedoras, no afectó parámetros productivos importantes (producción de huevos,

1 Profesora del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela.

2 Coordinador y Profesor del Centro de Biología Celular, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela

3 Director y Profesor del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela

consumo de alimento, ganancia de peso y conversión de alimento) (4).

La posibilidad de integrar otros insumos del sector primario de la economía del país tales como sub-productos agrícolas, al pescado ofertado por la pesca industrial o por la pequeña pesquería, son aspectos que merecen ser estudiados en torno a la tecnología del ensilado.

El presente trabajo persigue conocer la concentración de bromelina y papaína requerida para optimizar el proceso de obtención de ensilado microbiano de pescado a fin de controlar el proceso.

MATERIALES Y METODOS

Las preparaciones de papaína y bromelina utilizadas como estándar fueron obtenidas en Sigma Chemical Co., St. Louis MO. La papaína utilizada en la fabricación del ensilado de pescado se obtuvo del látex de la papaya y se presentó en forma de polvo crudo (E.C. 3.4.22.2.) con 2,8 Unidades/mg de sólido; mientras la bromelina (E.C. 3.4.22.4.), con 1870 Unidades/mg de sólido, se presentó en forma cristalina.

Preparación de las enzimas y de las muestras: La muestra a ser empleada como sustrato, en la medición de la actividad enzimática fue una mezcla de pescados de bajo valor comercial que incluía proporciones iguales de sardina (*Sardinella anchovia*) y perlitá (*Lepophidium profundorum*).

El pescado se molió entero (con cabeza, vísceras y esca-mas) en un moledor de carne marca BOIA HD, modelo 8122, con criba de 3,5 mm de diámetro. El producto molido fue liofilizado (liofilizador LABCONCO, modelo 180) durante 12 horas. El liofilizado fue colocado en envases herméticos y conservado a -10°C para su posterior uso, o bien fue suspendido en una solución de buffer fosfato de potasio 0,03M pH 7,2, mediante agitación a 4°C durante 2 horas. Posteriormente se procedió a una centrifugación (centrífuga marca Sorvall, modelo RC-5B) a 6000g durante 10 minutos a \pm 2°C.

El sobrenadante se dializó durante 72 horas a 4°C en tubos de diálisis de apertura de poro de 12.000. En las primeras 48 horas del proceso, los tubos de diálisis fueron colocados en agua destilada con gotas de tolueno (para evitar la contaminación de la muestra); en las 24 horas restantes la diálisis se realizó con solución buffer fosfato de potasio 0,03M a pH 7,0; 5,5 ó 4,0 según el ensayo a efectuar. Finalizado este tiempo, se verificó el pH del dializado y se determinó la concentración de proteínas (5).

Las muestras fueron guardadas a 2°C en frascos cerrados. El tiempo máximo de almacenamiento fue de una semana, puesto que después de este tiempo se descomponían.

Medición de la actividad enzimática: El método para la medición de la actividad enzimática se basó en la estimación de los productos de digestión de bajo peso molecular (material

soluble en ácido tricloroacético), formados a partir de las proteínas del pescado en presencia de la enzima, midiendo la absorbancia en la solución sobrenadante a 280 nm ó 275 nm dependiendo de la enzima (6,7).

Para estimar el efecto del tiempo sobre la actividad de la bromelina en la hidrólisis de las proteínas de la carne de pescado a pH 5,5, las muestras se incubaron a 35°C empleando diversos tiempos de incubación (30, 40, 50, 60, 120, 180, minutos) (6,7). Se efectuaron controles para establecer si ocurrió autodigestión de la enzima y autoproteólisis del sustrato durante el tiempo que duró el ensayo.

Se elaboraron 5 tipos de ensilados los cuales diferían en la concentración de bromelina adicionada. Estas concentraciones incluyeron: 0,00% (control); 0,20; 0,45%; 0,70% y 0,90% (peso de enzima/100 g de ensilado).

El esquema tecnológico del proceso de elaboración del ensilado microbiano de pescado fue el siguiente: molienda - envasado - acondicionamiento con 15% de melaza - adición de 1% de inóculo - adición de bromelina - homogeneización - almacenamiento.

Melaza: Se empleó una melaza proveniente del Central Azucarero de El Consejo, Edo, Aragua, Venezuela.

Preparación del inóculo: El inóculo fue obtenido a partir de tubos con caldo MRS los cuales contenían una población de *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 de hasta 1×10^8 UFC/g.

Análisis físico: El grado de licuefacción del ensilado se estimó con un consistómetro de Bosjtwick. Los resultados se expresan como cm recorridos/30 s.

Análisis químico: Se realizaron determinaciones de nitrógeno total (Nt) y de nitrógeno no proteico (NNP). El Nt se determinó según la metodología establecida por el A.O.A.C (8). Para el NNP se realizó precipitación con ácido tricloroacético al 20% (9) seguido de digestión y destilación según el método de micro Kjeldahl (8). Los resultados fueron expresados como porcentaje del Nt.

RESULTADOS Y DISCUSION

La respuesta de la actividad enzimática de la papaína a las variaciones de pH, sobre las proteínas del pescado, se presenta en la Tabla 1. Se puede apreciar que la actividad es mayor a pH 8,0 y 5,5 que a pH 4,0. Si se compara su actividad a los dos primeros valores de pH se puede concluir que es prácticamente indiferente emplear un pH u otro.

TABLA 1
ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE UNA
PREPARACION COMERCIAL DE PAPAÍNA SOBRE
LAS PROTEINAS DE LA CARNE DE PESCADO A
TRES VALORES DE pH.

A B S O R B A N C I A (280 nm)			
PAPAÍNA (mg)	pH 8,0	pH 5,5	pH 4,0
0,780	0,177	0,196	0,126
1,300	0,187	0,198	0,142
1,560	0,210	0,198	0,169
1,750	0,236	0,224	0,176
2,350	0,227	0,229	0,193
3,150	0,228	0,223	0,217

En el caso de la actividad de la bromelina (Tabla 2) su mayor actividad se presenta a pH, 5,5 y 7,2. Su actividad se ve afectada a pH 4,0 siendo dos veces menor al compararla con los valores obtenidos a pH 5,5 y 7,2.

TABLA 2
ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE UNA
PREPARACION COMERCIAL DE BROMELINA
SOBRE LAS PROTEINAS DE LA CARNE
DE PESCADO A TRES VALORES DE pH.

A B S O R B A N C I A (275 nm)			
BROMELINA (mg)	pH 7,2	pH 5,5	pH 4,0
0,500	0,361	0,327	0,117
0,750	—	0,430	0,195
1,000	0,439	0,533	0,235
1,500	0,623	0,601	0,311
2,000	—	0,603	—
3,000	0,703	0,680	0,381

En la Tabla 2 se observa que tanto a pH 7,2 como 5,5 se requiere una cantidad de enzima en el sistema de 1,5 mg ó más para alcanzar la velocidad máxima de la reacción, lo que equivale a 5% de proteína (peso de proteína enzimática/100 de proteína del pescado; relación E:S de 1:20).

Si se comparan las actividades enzimáticas de ambas preparaciones a los tres valores de pH sobresale la superioridad de la bromelina sobre la papaína, incluso a pH 4,0 que es donde su actividad se ve realmente disminuida.

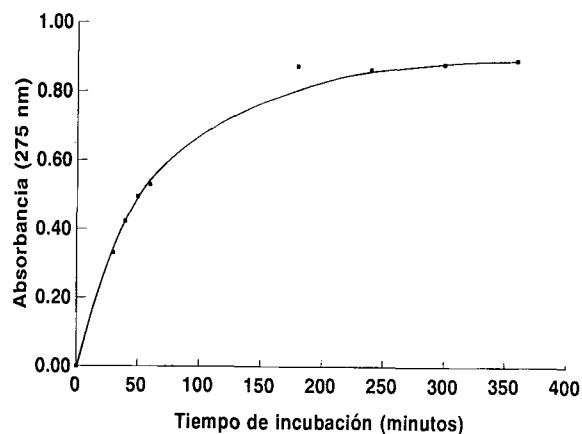
El hecho que la bromelina presente una elevada actividad a un pH ácido (5,5) la hace ideal para ser incorporada en el proceso de obtención del ensilado microbiano de pescado; en tal sentido, varios investigadores han reportado que hidrolizados proteicos elaborados con esta enzima poseen generalmente un adecuado valor nutritivo y no presentan problemas de

toxicidad como consecuencia de la actividad enzimática (10-13).

Establecida la superioridad de la bromelina sobre la papaína en la hidrólisis de las proteínas de pescado, se procedió a estudiar el efecto del tiempo sobre la actividad enzimática de la bromelina a los valores de pH y concentración de enzima establecidos como óptimos en los ensayos anteriores (pH 5,5 y proporción E:S de 1:20).

Los resultados de la actividad hidrolítica de la bromelina sobre las proteínas de la carne de pescado se muestran en la Figura 1. Se puede notar el aumento en la absorbancia a 275 nm a medida que aumenta el tiempo de incubación de la reacción. La evidencia más importante es que la mayor cantidad de proteína hidrolizada se obtiene durante las primeras dos horas de hidrólisis, alcanzando el máximo valor de absorbancia a las tres horas; después los productos de la reacción permanecen más o menos constantes hasta las seis horas de incubación que duró el experimento.

FIGURA 1
Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad
proteolítica de la bromelina a pH 5.5 (1.5 mg de proteína)



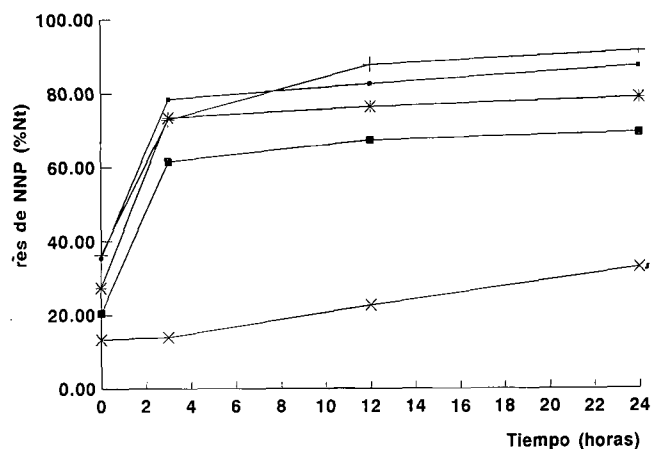
Se concluye entonces que es innecesario prolongar el tiempo de hidrólisis más de tres horas debido a los escasos aumentos que se logran en la proteólisis. En consecuencia, en la elaboración del ensilado de pescado en forma líquida, la máxima licuefacción del producto y los mayores porcentajes de NNP deben alcanzarse al cabo de este tiempo.

A continuación se elaboró el ensilado microbiano de pescado agregando diferentes concentraciones de bromelina, basadas éstas en los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas con anterioridad. Esto permitió establecer cómo influye la cantidad de enzima presente en el sistema sobre el grado de licuefacción del ensilado. También se pudo determinar el tiempo requerido para obtener un producto completamente líquido.

En relación al NNP, originado en la hidrólisis enzimática (Figura 2), se puede notar que en todos los ensilados elaborados, exceptuando el control, sin bromelina, el mayor grado de proteólisis se alcanza al cabo de las tres primeras horas de almacenamiento, y posteriormente sólo ocurre ligeros aumentos en los valores de nitrógeno.

FIGURA 2

Contenido de nitrógeno no proteico (NNP) de ensilados elaborados a partir de una mezcla de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo, concentraciones variables de bromelina, almacenados a 35°C

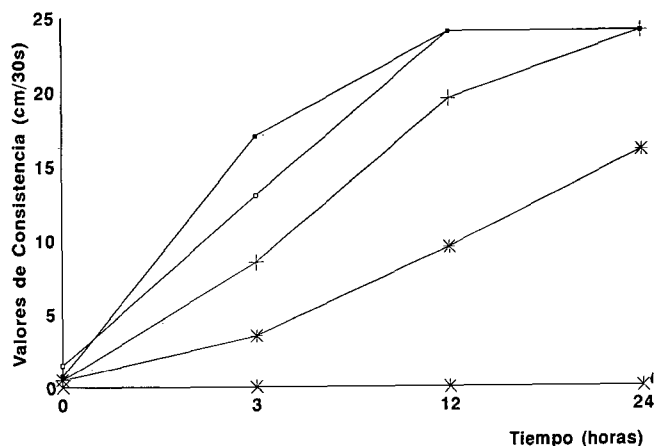


Los resultados de NNP obtenidos en el caso del ensilado E5 (control, sin bromelina), indican la existencia de actividad proteolítica endógena causada por las enzimas naturales presentes en el pescado, detalle este que no se observó en los ensayos bioquímicos, probablemente por los daños causados a estas enzimas durante los tratamientos de liofilización, homogeneización, centrifugación y diálisis a los que fueron sometidas las muestras.

En la Figura 3 se observa que los ensilados E1 y E2, que son los que contienen la mayor concentración de bromelina, tuvieron prácticamente el mismo grado de hidrólisis y alcanzaron licuefacción máxima en el mismo tiempo (12 horas). Los ensilados E3 y E4, con una menor cantidad de bromelina presente, sufrieron hidrólisis más lentamente que los dos anteriores. El E3 alcanzó el mismo valor máximo de licuefacción que E1 y E2 a las 24 horas.

FIGURA 3

Valores de consistencia de ensilados elaborados a partir de una mezcla de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo, concentraciones variables de bromelina, almacenados a 35°C



Estos resultados evidencian que existe una marcada superioridad en la proteólisis cuando se utilizan enzimas comerciales en comparación con la hidrólisis de las enzimas endógenas, lo que pone de manifiesto la importancia que tiene el empleo de la bromelina en este proceso hidrolítico. La puesta en práctica de estos hallazgos permitiría tanto obtener el producto final en un tiempo considerablemente menor al requerido actualmente, como un mejor aprovechamiento de los desperdicios de pescado, fuente invaluable de proteínas, provenientes de las pesquerías y de ciertos sub-productos agrícolas tales como restos de piña, puesto que al determinarse la cantidad de bromelina activa presente en la corteza y/o jugo de piña se establecería, con los logros hallados en este trabajo, la cantidad de tales desechos que deben ser incorporados al proceso para optimizarlo. Más aún, la preparación de bromelina empleada en este trabajo no es costosa, de allí que su uso no aumentaría mayormente el costo del proceso, con la ventaja de tener una licuefacción mucho más rápida, reproducible y controlada.

REFERENCIAS

1. Guevara Y.; Bello R. y Montilla J. 1989. Evaluación del ensilado de pescado por vía microbiana como suplemento proteico en dietas para pollos de engorde. Arch. Latinoam. Nutr. 4(2): 246-256.
2. Ottati M. Bello R. 1990. «Ensilado microbiano de pescado en la alimentación porcina. II. Evaluación de la canal y caracterización de la carne». Alimentaria, Abril 90, 37-44.
3. Reyes G.; Martínez R.; Rodríguez L.; Bello R. y Pascual M. 1991. «Efecto de la Adición de desechos de frutas tropicales sobre la velocidad de producción de ensilado microbiano de pescado». Alimentaria Enero-Febrero 91, 99-108.

4. Guevara Y. 1992. Estudio sobre la Factibilidad de inclusión de ensilado de pescado elaborado por vía microbiológica, en dietas para aves. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
5. Lowry O.; Rosebough N.; Lewistarr A. y Randall R. «Protein Measurement with the Folin phenol reagent». J. Biol. Chem. 193, 265. 1951.
6. Kunitz, M. 1947. J. Gen. Physiol. 30, 291.
7. Arnoon, R. & Shapira, E. 1967. «Papain». Biochemistry 6, 3942.
8. A.O.A.C. Official Methods of Analysis «Association of Official Agricultural Chemist, 13th edition, Washington, DC. 1990.
9. Stansby M; Harrison R.; Dason J. y Sater M. Determining volatile bases in fish. Comparison of precision of certain methods. Industrial and Engineering Chemistry, 16: 593. 1944.
10. Meinke W. 1959. Tenn Eng Expt. Sta. News. Marzo de 1959. Citado por Bertullo, E. 1989.
11. Meinke, W. Food and Nutrition Board NAS-NCR. 2nd Mect of Sci. Advis. Common Marine Protein Concentrate. Washington, DC. Marzo 23-25. 1964.
12. Instituto de Fomento Pesquero (Chile). Un proceso para preparar un concentrado proteico de alto valor energético. Solic. Patente en Uruguay N° 17897. Citado por Bertullo, E.; 1989. Desarrollo del ensilado en América Latina. En: «II Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina». FAO RLAC/2 Montevideo.
13. Ballester E., Yanez, E., Brunser O., Stekel A., Chedud P., Castaño G y Monckeberg F. «Safety Evaluation on an Enzymatic Fish Protein Hydrolysate: 10-month Feeding Study and Reproduction Performance in Rats». J. of Food Sci. 42 (2) : 407. 1977.

Recibido: 06-07-1994

Aceptado: 10-08-1995

Uso del germen desgrasado de maíz en harinas compuestas para panificación

Marisela Granito ¹, y Marisa Guerra ²

Universidad Simón Bolívar, Caracas

RESUMEN. La harina de germen desgrasado de maíz es un subproducto de la molienda seca del maíz actualmente subutilizado para consumo humano. En este estudio se caracterizó fisicoquímicamente dos muestras de diferente granulometría de germen desgrasado de maíz: Fracción fina (FF) y Fracción media (FM) y se incorporaron a harinas de trigo (HT) para obtener harinas compuestas con niveles de sustitución de 5 - 10 - 12 y 15 %. Con estas mezclas se elaboraron a nivel de panadería comercial panes de molde los cuales fueron analizados desde el punto de vista fisicoquímico y sensorial. Se encontró que FF y FM aportan de 20 a 35 % de Fibra Dietética Total (FDT). De los panes elaborados se seleccionaron los que contenían 10 % de FM y 10% de FF por no diferir, a un 95 % de confiabilidad, en cuanto a peso específico, color sabor y textura de los panes elaborados con 100 % de HT. En la prueba de aceptabilidad realizada a 200 consumidores se encontró que el pan con 10% de FF era más aceptado (48 %) que el de 100% de HT y el de 10% de FM presentó igual nivel de aceptación (28 %) que el control. Se puede concluir que el germen desgrasado de maíz representa una materia prima nacional disponible, susceptible de ser utilizada en panificación como sustituto parcial del trigo importado.

SUMMARY . The use of industrial deffated corn germ in breadmaking. The flour of deffated corn germ is a by - product of the corn industry milling dried which is actually subutilized in human consumption. In this study, two samples of corn deffated germ of different particle size were physicochemically characterized: fine fraction (FF) and medium fraction (FM) and they were added to wheat flours to obtain composite flours with substitution levels of 5- 10- 12- 15 % mixtures. These mixtures were used to manufacture sandwich bread in bakeries, which were physico-chemically and sensorially analyzed. (FF) and (FM) were found to provide from 20 to 35 % of dietary fiber. From the manufactured bread loaves, the ones containing 10 % of (FM) and 10% of (FF) were selected because they did not differ in specific weight, color, flavor and texture at a 95% confiability from those elaborated with 100% wheat flour. In the acceptability test given to 200 consumers, it was found that bread with 10% FF substitution was more widely accepted (48 %) than that containing 100% wheat flour; and that of 10 % of (FM) had the same level of acceptability (28 %) as the control bread. It can be concluded that the deffated corn kernel represents a raw material available in this country that could be used in bread elaboration as a partial replacement for imported wheat.

INTRODUCCION

En Venezuela como subproducto del proceso de fabricación de la harina precocida de maíz se obtiene una mezcla de germen, pericarpio y fracciones de endospermo que recibe el nombre de «material extraíble», debido a que posteriormente es sometido a extracción con solventes para obtener aceite de

maíz. Completado el proceso de extracción, se genera otro subproducto denominado «torta desgrasada de maíz», el cual luego de ser sometido a diferentes fraccionamientos y tamizados, origina fracciones más finas ricas en proteínas, fibra dietética total, vitaminas y minerales (1). En la actualidad estas fracciones se utilizan en la elaboración de alimentos para animales, excepto las de menor granulometría que recientemente comenzaron a utilizarse en la industria cárnica, de pasapalos extruídos y de los condimentos (2).

Por otra parte se tiene que el consumo de productos a base de trigo es muy alto. Según las Hojas de Balance (3) el pan es uno de los rubros más consumidos entre los diferentes estratos de la población. El 37 % de la harina de trigo producida se

1 Profesor Ordinario Agregado, Jefe del Dpto. de Tecnología de Servicios. Núcleo del Litoral. Universidad Simón Bolívar. Valle de Camurí Grande
2 Profesor Ordinario Titular. Dpto. de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Universidad Simón Bolívar. Valle de Sartenejas

utiliza en la elaboración de pan, por lo que se podría pensar que este alimento sería un buen vehículo para llevar a la población calorías, proteínas y fibra dietética. No obstante, al ser la harina de trigo (75 % de extracción) deficiente en lisina, triptófano, algunos minerales y fibra dietética se podría mejorar su valor nutricional mezclándola con otras harinas de origen vegetal o con alguno de los sub-productos del procesamiento industrial del maíz actualmente poco utilizados.

Estos subproductos aportan de un 21 a 45 % de fibra dietética total, 4 a 5 % de lisina disponible (4) y mejoran la textura de los alimentos a los que son incorporados al incrementar la absorción de agua y grasa de los mismos (5).

Varios son los estudios realizados sobre la incorporación de la harina de germen de maíz desgrasado en alimentos. Se ha evaluado la aceptabilidad de galletas y panecillos preparados con harina de trigo fortificada con 25 % de harina de germen desgrasado de maíz (6). Asimismo, este subproducto ha sido usado a un nivel de sustitución de 12% en panificación con excelentes resultados (7) y en macarrones donde la sémola comercial se mezcló con 10, 20, y 30 % de harina de germen desgrasado, sin alteraciones del sabor, ni la textura (8). También se han obtenido buenos resultados al sustituir las costosas proteínas cárnicas por harina de germen desgrasado de maíz en embutidos (9). Recientemente se reportó la incorporación de harina de germen de maíz a masas para panificación y se analizaron las alteraciones producidas en las propiedades reológicas de las mismas (10).

Dado que en nuestro país el trigo se importa en su totalidad, sería de interés estudiar la factibilidad técnica de incorporar harinas de germen desgrasado de maíz a un producto tan altamente consumido como el pan, porque al ser esos subproductos obtenidos a través de un proceso industrial ya tradicional en el país, tienen un costo muy inferior al de la harina de trigo.

Considerando lo antes expuesto, en este trabajo se pretendió caracterizar y evaluar la factibilidad de incorporar, distintas fracciones del germen desgrasado de maíz obtenido industrialmente, a harinas compuestas destinadas a panificación.

Específicamente se plantearon los siguientes objetivos:

- * Recolectar y caracterizar distintas fracciones de germen desgrasado de maíz obtenidas como sub-producto de la extracción industrial del aceite de maíz y seleccionar en base a análisis fisicoquímicos las fracciones más adecuadas.
- * Formular y seleccionar en base a parámetros fisicoquímicos y evaluación sensorial, la mejor mezcla para la elaboración de pan de molde adicionado con las mejores fracciones.
- * Estudiar en forma comparativa algunas propiedades reológicas de las masas obtenidas a partir de mezclas harina de trigo-fracción de germen desgrasado de maíz.
- * Caracterizar fisicoquímica y sensorialmente el pan preparado con la fórmula más adecuada.

MATERIAL Y METODOS

Materia prima

Inicialmente se caracterizaron cuatro sub-productos del procesamiento del germen desgrasado de maíz: la torta desgrasada (TD), el subproducto FG retenido en la malla 40 (tamaño de poro = 425 μm), FM retenido en la malla 60 (tamaño de poro = 250 μm) y FF que pasaba a través de las mallas 80 y 100 (tamaño de poro < 175 μm) (Tabla 1). Los muestreos se realizaron en una industria local, directamente en la línea de producción a nivel de las salidas del tamizador, usando para ello bolsas de polietileno.

Se usó harina de trigo (HT) para panificación de un 75 % de extracción, procedente de un molino de la zona metropolitana.

La levadura, manteca vegetal, sal, azúcar refinada y conservadoras fueron adquiridos en comercios locales.

Las pruebas de panificación se realizaron en una panadería comercial, los farinogramas en el laboratorio de Control de Calidad de una empresa local.

TABLA 1
GRANULOMETRIA DE LOS SUBPRODUCTOS
MUESTREADOS A NIVEL DE PLANTA Y DE LA
HARINA DE TRIGO

MALLA	TAMAÑO	% DE RETENCION				
	PORO μm	TD	FG	FM	FF	HT
20	850	45,40	95,60	2,40	1,30	23,90
40	425	18,30	3,33	37,90	6,30	66,40
60	250	17,80	0,35	36,30	23,00	6,70
80	175	6,80	0,28	18,10	21,10	0,24
100	150	—	—	2,30	30,10	1,30
FONDO		11,60	0,44	0,10	16,80	0,60

Métodos

Con el propósito de seleccionar las fracciones más adecuadas del germen desgrasado de maíz, se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos:

Granulometría para determinar el tamaño de la partícula se usó un vibrador Sieve Shaker, modelo Rx-86 y un conjunto de tamices Tyler N° 20, 40, 60, 80 y 100 mesh, con diámetros de abertura de 0,850mm, 0,425 mm, 0,250 mm, 0,175mm y 0,150 mm respectivamente. Se utilizó una muestra de 100 g y un tiempo de vibración de 10 minutos a la máxima intensidad del aparato. Se determinó el porcentaje de material retenido en cada tamiz, respecto al peso inicial de la muestra. Los resultados fueron el promedio de dos determinaciones.

Humedad se utilizó el método oficial de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (11).

Proteína Cruda se utilizó el método oficial de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (12).

Fibra Dietética Total. Para esta última se usó la combinación de métodos gravimétricos y enzimático desarrollada por Prosky y col. (13).

Las fracciones seleccionadas fueron objeto de otros análisis:

Grasa Cruda se hizo una hidrólisis ácida previa a la extracción (modificación Weibull) (14).

Cenizas se utilizó el método oficial de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (15).

Color se determinó mediante un Colorímetro Triestímulo Garder XL-23, el cual permite medir valores de reflectancia que definen el color visible de un material (16).

Aflatoxinas (17), Aeróbios mesófilos (18), Hongos y Levaduras (19) y Coliformes Totales (20), todos estos métodos oficiales de la Comisión Venezolana de Normas Industriales.

A partir de la harina de trigo y de las fracciones de germen desgrasado de maíz seleccionadas, se prepararon las siguientes mezclas o harinas compuestas: 95 % HT + 5 % FM, 95 % HT + 5 % FF, 90 % HT + 10 % FM, 90 % HT + 10 % FF, 88 % HT + 12 % FM, 88 % HT + 12 % FF, 85 % HT + 15 % FM, 85 % HT + 15 % FF y 100 % HT. El mezclado se realizó en una mezcladora mobart a una velocidad media por 10 minutos.

A cada una de las mezclas se le determinó humedad (11) y color (16). También se realizaron **farinogramas** por duplicado a todas las mezclas con el propósito de verificar si la presencia de la harina de germen desgrasado de maíz alteraba algunas de las propiedades reológicas de las masas (21). Para ello se usó un farinógrafo Brabender OHG, modelo 220.

Formulación del pan

Se usó el Método Directo (22), por ser el método más empleado en las panaderías de Venezuela. La fórmula usada para elaborar el pan fué la reportada por Quaglia (22). Se prepararon baches de 2 Kg cada vez.

Evaluación fisicoquímica y sensorial de los panes

Transcurridas 24 horas del horneado, se midió el volumen mediante el método de desplazamiento de semillas (23), el peso específico y el color (16). Los resultados obtenidos para estas características fueron sometidos a análisis de varianza simple (24).

Las muestras de pan que no difirieron significativamente del control en lo que respecta al volumen y peso específico, se sometieron a pruebas de análisis sensorial con un grupo de jueces entrenados, que debieron recibir un entrenamiento adicional en perfiles de textura. Para entrenar a los jueces en el perfil de textura en el cual se median dureza, masticabilidad y elasticidad, se utilizaron escalas, donde cada número de la

escala estaba asociado a una intensidad en la característica que se quería medir y a un producto. Las escalas usadas fueron las del CIEPE (25) modificadas atendiendo a las características de los productos disponibles en la zona. El entrenamiento del panel duró mes y medio y consistió en dos etapas. Durante la primera los jueces recibieron 2 veces por semana una escala de diferentes productos para cada característica: dureza, masticabilidad y elasticidad. Al finalizar la sesión se comparaban los resultados y se discutían hasta lograr un mismo ordenamiento de los productos para todos los jueces (26). Una vez que los jueces se identificaron con las diferentes escalas, se les suministraron varios tipos de panes a fin de que los ubicaran en la escala aprendida. Todos tenían que coincidir en la apreciación.

Una vez entrenado el panel se procedió a la evaluación sensorial de todos los panes formulados. Para ello se realizó una prueba de «Escala de Calidad Estructurada» para evaluar el color, el sabor y la dureza mediante una escala de 9 puntos (0= extremadamente pobre, 8=excelente) (25).

Producto de esta primera evaluación sensorial, se seleccionaron los panes con niveles de aceptación superiores a «5 = bueno» para el color y sabor y se les hizo una nueva caracterización fisicoquímica y sensorial. En relación a esta última se realizó a nivel de laboratorio, una prueba de Escala de Calidad Estructurada (25) usando una escala de 9 puntos, para evaluar el color y el sabor y una de Perfil de Textura de 5 puntos, donde 1= muy duro, masticable o elástico y 5= muy blando, poco masticable y poco elástico (26). La prueba se repitió cuatro veces con cada panelista.

A nivel de consumidores se realizó una prueba de Preferencia con 200 posibles consumidores a los que se le presentaban las tres muestras de pan y se les preguntaba cual preferían (26).

Todos los resultados obtenidos de las pruebas sensoriales fueron sometidos a análisis de varianza (24). Se realizó la comparación de medias por el Test de Duncan usando el programa «Statview».

RESULTADOS

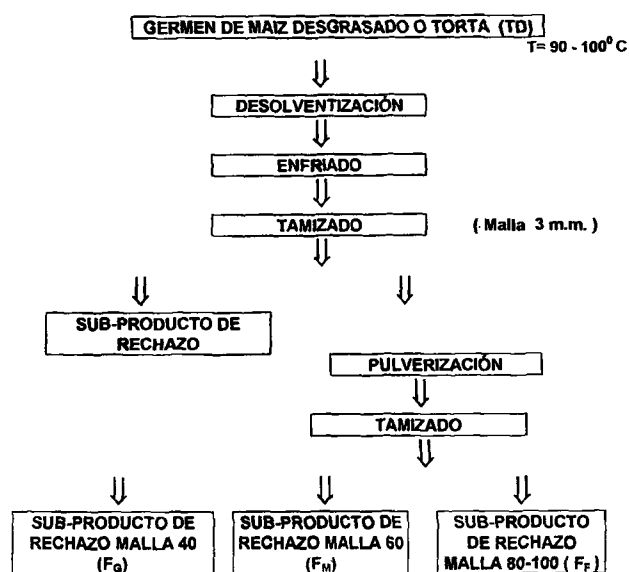
En la Tabla 1 se presentan los resultados de la granulometría realizada a los diferentes sub-productos muestreados a nivel de planta y a la HT. Entre TD y FG hay un proceso de molienda y de tamizado, lo que explicaría las diferencias en el tamaño de las partículas entre ambos. TD presentó una granulometría mucho más heterogénea que FG, de allí que el mayor porcentaje de retención correspondió a la malla de 20 mesh (45,40 %). Se observaron también porcentajes importantes para la malla de 40 mesh (18,30 %) y para la malla de 60 mesh (17,80%). Para FG el 95,60% de las partículas presentaron una granulometría mayor o igual a 850 µm.

Es importante señalar que en la obtención de los subproductos restantes, FG, FM y FF el único proceso que se efectuó fue una separación física por tamices (Figura 1). Como se puede observar en la Tabla 1, más del 90 % de

retención de FM se obtuvo entre los tamices 40 y 80 mesh, mientras que para FF se ubicó entre 60 y 100 mesh. En consecuencia para FM el tamaño de partícula predominante se presentó entre 250 y 425 μm y para FF era menor o igual a 150 μm .

FIGURA 1

Diagrama de flujo del procesamiento industrial del germen desgrasado de maíz



En relación a HT, el tamaño de su partícula estaba en el rango de 425 μm a 850 μm .

Considerando que incorporar un ingrediente con granulometría muy superior a la de HT podría alterar las propiedades texturales del producto final (27), se seleccionaron y emplearon en la elaboración de las harinas compuestas los subproductos FM y FF porque el tamaño de sus partículas fue menor o igual al de HT, aún cuando desde el punto de vista de calidad panificable ambas fracciones disminuirían el porcentaje de gluten presente y por ende características físicas del pan, como el volumen y el peso específico (28).

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis proximal y de fibra dietética total de los subproductos muestreados y de la HT. En cuanto al contenido de humedad y proteína se pueden observar valores similares entre FM y FF. El contenido de proteína para las diferentes fracciones fue de 12,86 % similar al reportado por otros autores (4). De acuerdo a la Norma COVENIN N° 217-89 (29) el porcentaje de proteína del componente farináceo debe ser como mínimo 13,5 %. Sin embargo considerando que las fracciones que se seleccionarían para elaborar las harinas compuestas estarían en proporciones inferiores a un 15 % de sustitución y que la HT tenía 14,5 de proteína se consideró que este no sería un factor limitante.

TABLA 2
COMPOSICION PROXIMAL Y CONTENIDO DE FIBRA DIETETICA TOTAL DE LOS SUBPRODUCTOS SELECCIONADOS Y DE LA HARINA DE TRIGO

Componente g/100g	FM	FF	HT
Humedad	9,30±0,18	9,28±0,18	12,40±0,20
Proteína cruda Nx/6,25	12,86±0,21	12,86±0,29	14,56±0,18
Grasa cruda	1,33±0,06	1,02±0,11	1,58±0,1
Cenizas	4,05±1x 10 ⁻³	3,96±0,48	0,68
Carbohidratos ¹	36,56	50,98	70,78
Fibra dietética TOTAL	35,90±0,14	21,36±0,21	3,25±0,41

¹ Calculado por diferencia. No incluye aquellos que forman parte de la fibra dietética total.

En cuanto al porcentaje de grasa cruda el valor obtenido es ligeramente inferior a 1,3 % reportado por Pacheco (4), probablemente debido a pequeñas diferencias en el nivel de extracción y a diferencias metodológicas. En relación al contenido de cenizas se obtuvieron valores entre 4,05 % para FM y 3,96 % para FF. Al comparar el contenido de cenizas de las fracciones FM y FF con el de HT que fue de 0,68 se puede inferir que la presencia de dichas fracciones en las harinas compuestas probablemente contribuyen a aumentar el contenido de minerales. Finalmente, en relación a los contenidos de fibra dietética total se puede observar que fueron diferentes para ambas fracciones probablemente debido al proceso de tamizado el cual va eliminando las partículas más grandes que suelen ser las de pericarpio, ricas en fibra (30). En la Tabla 3 se presentan los valores de color obtenidos para FM, FF y HT. En relación a la luminosidad («L») la HT presentó el mayor valor, seguida por FF y FM. Para explicar lo observado se podrían considerar dos factores, la presencia de fibra y el tamaño de la partícula. Se ha encontrado que la presencia de fibra altera la luminosidad de las muestras y esta alteración está íntimamente relacionada con el tamaño de la partícula del material (31).

TABLA 3
COLOR DE LOS SUBPRODUCTOS SELECCIONADOS
Y DE LA HARINA DE TRIGO

Muestras	Color			
	Luminosidad L	a	b	Blancura %
HT	90,76+0,060	0,59+0,01	19,15+0,01	97,70
FM	77,05+0,02	5,14+0,42	22,91+0,05	83,00
FF	82,51+0,19	3,52+0,05	22,42+0,16	88,88

% Blancura = $L \times 100$

L placa patrón

Los resultados se expresan en términos de promedio de tres determinaciones y su desviación estándar.

El valor « L » equivalente a la blancura o brillo, se incrementó para las fracciones a medida que el tamaño de la partícula disminuyó. Esto significa que mientras más finas eran las partículas, más brillantes o blancas eran las harinas. Esto concuerda con lo reportado por otros autores (31) quienes encontraron un incremento significativo en «L» cuando el tamaño de la partícula disminuía. En relación al valor encontrado para HT, si bien el tamaño de sus partículas era comparativamente mayor que el de las fracciones FM y FF, el porcentaje de blancura era mayor probablemente debido a diferencias en la composición de los materiales. Es importante recordar la presencia de fracciones de pericarpio (amarillo en el caso del maíz) en FM y FF y que no están presentes en HT.

Con el objetivo de caracterizar en forma integral los subproductos seleccionados y la HT, se realizaron análisis microbiológicos y de aflatoxinas. Se encontraron valores de aeróbios mesófilos de $7,5 \times 10^3$ para FF y de $4,3 \times 10^3$ para FM, inferiores a lo permitido por la Norma COVENIN 217-89 (29). De igual forma para hongos y levaduras se encontraron valores por el orden de 10^2 .

El contenido de aflatoxinas de FF (15ppb) fue inferior a la cantidad límite establecida para el consumo humano por la FDA (20ppb), e igual para FM.

Una vez caracterizadas las diferentes fracciones de harina de germen desgrasado de maíz y la harina de trigo, se procedió a preparar las mezclas en las proporciones ya señaladas, considerando que de acuerdo a diferentes autores, algunos parámetros de calidad del pan como el volumen, textura de la miga y el color, comienzan a deteriorarse cuando los niveles de suplementación son superiores a 10% y se hacen inaceptables cuando llegan a 20% (32,31).

Las características farinográficas de las distintas mezclas se presentan en la Tabla 4. El porcentaje de absorción de agua de todas las mezclas fue superior al de la harina de trigo y aumentó a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución. Estos resultados coinciden con los reportados por Navickis y Nelsen. (10) quienes señalan que a 500 BU las masas adicionadas de 5% de diferentes fuentes de fibra, incrementaban su contenido de agua por sobre la del control.

TABLA 4
CARACTERISTICAS FARINOGRAFICAS DE LAS
MEZCLAS

Muestras	Absorción de agua (%)	Tiempo de desarrollo 0 (min)	Resistencia (min)	Estabilidad (min)	Tolerancia al mezclado (UB)
100% HT	67,0	2,1	19,50	17,40	30
5% FF	68,0	6,9	18,20	16,60	45
5% FM	67,9	6,3	17,50	17,50	35
10% FF	68,9	6,2	16,00	14,50	35
10% FM	68,7	8,0	19,50	18,50	25
12% FF	69,4	6,8	16,00	14,50	25
12% FM	69,4	6,8	19,90	17,80	35
15% FF	70,2	6,1	17,50	15,90	30
15% FM	69,4	7,2	19,50	17,50	35

Los resultados de esta tabla son el producto de dos determinaciones

La estabilidad de las masas con FF disminuyó en relación a la de la harina de trigo, sin embargo para las mezclas con FM la disminución fue inferior, por lo que se podría pensar en un efecto originado por el tamaño de partícula. Es de destacar que el tamaño de partícula de FM es muy similar a la de HT, mientras que el de FF es más pequeño.

En la Tabla 5 se presentan los resultados correspondientes al volumen y peso específico de los panes elaborados. Como se puede observar, el peso específico varió desde 0,18 g/cc para la mezcla con 5% de FM hasta 0,37 g/cc para la mezcla con 15% de FF, no encontrándose diferencias significativas entre los pesos específicos de los panes de las mezclas 5% FM, 5% FF, 10% FF y el preparado con 100% HT. Esto concuerda con lo reportado por Barber y col. (33), quienes al estudiar comparativamente pan blanco e integral encontraron pesos específicos entre 0,18 g/cc y 0,45 g/cc. Cabe señalar que los panes elaborados con las mezclas donde la sustitución fue superior a 10%, tanto de FM como de FF, presentaron pesos específicos ligeramente superiores y significativamente diferentes a los de HT. Por esta razón se seleccionaron los panes con 10% de sustitución. Entre las causas bioquímicas que explican el comportamiento anterior se podría señalar la reducción en el contenido de Glutacion reducido lo cual es proporcional al aumento en el porcentaje de sustitución.

TABLA 5
VOLUMEN Y PESO ESPECIFICO DE LOS PANES

Muestras	Volumen (cc)	Peso Especifico (g/cc)
100% HT	3,44 a	0,18 a
5% FF	3,29 a	0,20 a
5% FM	3,46 a	0,18 a
10% FF	3,32 a	0,20 a
10% FM	2,88 b	0,22 b
12% FF	2,89 b	0,22 b
12% FM	2,81 b	0,23 c
15% FF	2,45 d	0,36 d
15% FM	2,43 c	0,27 e

Los promedios con letras comunes en una misma columna no presentaron diferencias significativas con $\alpha = 0,05$

El contenido de proteína así como el de grasa no presentó diferencias significativas entre los distintos panes, no obstante el de cenizas fue mayor para los panes con FM y FF, lo que resulta obvio dado el alto contenido de fibra de dichas fracciones. El contenido de FDT fue superior para los panes elaborados con FM, seguido por los elaborados con FF. La diferencia fue originada por las diferencias en el contenido de FDT de la materia prima.

Adicional a esta fibra se debe considerar la fibra aportada por el proceso de panificación «per se» el cual aumenta hasta en un 2 % el contenido de FDT (34). Aparentemente los almidones resistentes y los productos de las reacciones de oscurecimiento que se forman durante el proceso de panificación, constituyen la principal fuente de esta fibra adicional (35).

Los aportes calóricos de los panes con FF y FM fueron inferiores a los elaborados con 100 % de HT. Esto unido al incremento en el aporte de fibra básicamente insoluble, que presentan los panes preparados con FF y FM en relación a los de HT sugiere el uso de este producto para regímenes especiales de adelgazamiento. Asimismo si se considera el alto contenido de lisina que presenta el germen desgrasado de maíz (4), a pesar de las pérdidas que puedan ocurrir durante el horneado, se podría pensar en un incremento en la calidad proteínica del producto final.

Respecto al color medido sensorialmente, en la Tabla 7 se puede observar que el puntaje fue superior para los panes con 10 % de sustitución de FF y FM. De las observaciones de los panelistas se pudo deducir que los panes con las sustituciones parciales de las fracciones tenían un color ligeramente crema que los hacía más atractivos a la vista.

En relación al sabor el pan más preferido fue el que tenía 10% de FF, seguido por el de 10% de FM. El menos preferido tanto por sabor como por color fue el pan control. Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto a dureza y masticabilidad entre los panes con 10 % de sustitución y los de 100 % de Ht.

Esta mayor aceptabilidad para los panes con sustitución parcial de la HT por FF y FM se evidenció también en la prueba de preferencia realizada a nivel de consumidores según la cual los panes con FF obtuvieron un 48 % de preferencia sobre los de FM cuya aceptabilidad fue de 28 % igual a la del pan control.

TABLA 6
COMPOSICION PROXIMAL Y APORTE CALORICO DE LAS FORMULAS FINALES

COMPONENTE g/100 g	PANES		
	10% FM	10 % FF	100 % HT
Humedad	8,50± 0,06	8,00±0,12	6,00±0,03
Proteína (N x 6,25)	13,65±0,16	13,55±0,06	13,75±0,25
Grasa Cruda	3,45±0,05	3,30±0,23	3,00±0,16
Cenizas	2,80±0,02	2,60±0,34	1,63±0,02
Fibra Dietética Total	5,63±0,23	4,25±0,29	2,37± 0,17
Carbohidratos (Por diferencia)	65,97	68,30	73,25
* KCAL/100 g	349,54	357,10	375,00

Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones y de desviación estándar.

* Datos calculados de acuerdo a los valores de Atwater .

TABLA 7
EVALUACION SENSORIAL DE LAS FORMULAS FINALES. (PANEL ENTRENADO)

Muestras	PRUEBAS SENSORIALES				
	TEXTURA				
	Color *	Sabor *	Dureza+	Mastica- bilidad+	Elasticidad+
100% HT	6,2 a	6,6 b	3,2 c	2,0 d	4,2 e
10% FF	7,0 a	7,0 b	2,8 c	2,0 d	4,2 e
10% FM	7,0 a	6,8 b	2,6 c	1,8 d	4,2 e

Los resultados con letras comunes no presentaban diferencias significativas a un $\alpha=0,05$

Utilizando una prueba múltiple rango de duncan.

* Se uso una escala de 9 puntos (0= extremadamente pobre, 8= excelente)

+ Se uso una escala de 5 puntos (1= muy duro, masticable o elástico, 5= poco duro, masticable o elástico)

CONCLUSIONES

Las fracciones de germen desgrasado de maíz analizadas representan una fuente potencial de calorías y fibra dietética total (20 a 30 %), susceptible de ser utilizada en el desarrollo de alimentos de alto consumo, como son los productos horneados de panificación.

Se esperaba que al utilizar estas fracciones en panificación se originaría un efecto «diluyente» sobre el gluten y por ende una disminución en la calidad global del pan, sin embargo, con los niveles de sustitución empleados se obtuvieron panes cuyos pesos específicos variaban entre 0,18 g/cc y 0,37 g/cc para la mezcla con 5 % y 15 % de sustitución de FF respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en lo que a volumen específico se refiere, entre el pan control (100 % HT) y los elaborados con las mezclas que contenían hasta un 10% de sustitución.

Al analizar sensorialmente los panes, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a dureza y masticabilidad entre los panes con 10% de sustitución y el control con 100% de HT. En relación al sabor el pan preferido fue el que tenía 10% de FF, seguido por el de 10 % de FM y finalmente el que tenía 100 % de HT. Al medir la preferencia a nivel de consumidor los resultados fueron similares.

De lo anterior se desprende que técnicamente es factible sustituir la harina de trigo por fracciones de germen desgrasado de maíz hasta niveles de 10 % sin que la calidad y aceptabilidad del pan elaborado se vea afectada.

REFERENCIAS

- Rodríguez, F.O. Producción Industrial, mercadeo y distribución de harina de maíz para la preparación de arepas en Venezuela en: Mejoramiento Nutricional del maíz. INCAP, Guatemala, 1987.
- REMAVENCA. Comunicación personal, 1992.
- I.N.N. Instituto Nacional de Nutrición. Hoja de Balance de Alimentos. Caracas, Venezuela, 1990.
- Pacheco, E. Obtención de concentrados proteínicos a partir de harinas de germen de maíz. Estudio de las propiedades funcionales. Rev. Fac. Agrn. Maracay XIV (3-4): 169- 180, 1986.
- Veter, J.L. Fiber as a Food Ingredient. Food Technol, 38 (10): 64-69, 1984.
- Blessin, C. W., Deatheraghe, W.L., Cavins, J., García, W.J. y Inglett, G.E. Preparation and properties of defatted flours from dry milled yellow, white and high lysine corn germ. Cereal Chem. 56(2): 105 - 109, 1972.
- Tsen, C., Mayibian, C. y Inglett, G. Defatted corn germ flour as a nutrient fortifier for bread. Cereal Chem. 51:262-263, 1974.
- Lucisano, M. Casiraghi, E.M, y Barbieri R. Use of defatted corn germ flour in pasta products. J. Food Sc. 49:482,1984.
- Gnanasambandam G.R. y Zayas J.F. Functionality of wheat germ protein in comminuted. Meat products as compared with corn germ and soy proteins. J. Food Science, 57 (4): 829-833, 1992.
- Navickis, L.L. y Nelsen, T.C. Mixing and extensional properties of wheat flour doughs with added corn flour, fibers and gluten. Cereal Foods World 37(1):30, 32-35, 1992.
- COVENIN 1553-80. Productos de cereales y leguminosas. Determinación de humedad. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela, 1980.
- COVENIN 1195-80. Determinación de nitrógeno. Método Kjeldahl. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela, 1980.
- Prosky, L. Asp. N.G. Furda. I. De Vries. J. Schweizer, T.F and Harland, B.A. Determination of total dietary fiber in foods, foods products, and total diets. Interlaboratory study. J. Assoc. of Anal. Chem. 67:1044, 1984.
- COVENIN 1785-81. Productos de cereales y leguminosas. Determinación de grasas. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela. 1981.
- COVENIN 1783-81. Productos de cereales y leguminosas. Determinación de cenizas. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela, 1981.
- Gardner Laboratory INC. «Color and color related properties A1-12C, Bethesda, Maryland 1976, p.7-18.
- Trucksess, M., Brumley, W. y Nesheim, S. Rapid quantification and confirmation of aflatoxins in corn and peanut butter, using disposable silica gel column, thin layer chromatography and gas chromatography/ mass spectrometry, J. Assoc. Off Anal. Chem. 67:973-975, 1984.
- COVENIN 902-78 Alimentos. Método para recuento de microorganismos aeróbios. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela, 1978.
- COVENIN 1337-78. Alimentos. Método para el recuento de hongos y levaduras. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela, 1978.
- COVENIN 1086-77. Alimentos. Método para recuento de bacterias coliformes en placas de Petri. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas. Venezuela, 1977.
- American Association of Cereal Chemist. Approved Methods of the AACC. Method 54-21 St. Paul, Mn. The Association, 1980.
- Quaglia, G. Ciencia y Tecnología de la Panificación. Ed. Acirbia, S.A.. Zaragoza, España, 1991 p. 239-258.
- Haridas, R. Shurpalekar, S. Utilization of milo in bakery products. J. of Food Science and Technol. 13(6): 293-299, 1977.
- Oestle, B. Estadística Aplicada. Ed. Limusa, México, 1982.
- Mackey, A.C., Flores de Marquez, I. y Sosa, M. Evaluación Sensorial de los Alimentos. Serie Manuales N° 2. ediciones CIEPE. San Felipe, Venezuela, 1984, p. 83-96.
- Wittig, E. Evaluación sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos. Talleres gráficos U.S.A.C.H. Chile, 1986, p. 61-62.
- Hudson, C.A. Chiu, M.M. y Knuckles, B.E. Development and characteristics of high fiber muffins with oat bran, rice bran, or barley fiber fractions. Cereal Foods World 37(5): 373-378, 1992.
- Haseborg E. y Himmelstein A. Quality problems with high-fiber breads solved by use of Hemicellulase enzymes. Cereal Foods World 33(5): 419-427, 1988.
- COVENIN 217-89. Harina de trigo. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas, Venezuela, 1989.
- Polizzoto, L.M. Tinsley A. M. Weber, C.W. y Berry, J. W. Dietary fibers in muffins. J. Food Sc. 48:111-118, 1983.
- Shogren, M.D. Pomeranz Y. y Finney K.F. Counteracting the deleterious effects of fiber in breadmaking. Cereal Chem. 58(2):142-144, 1981.
- Kurimoto, J. y Shelton, D.R. The effect of flour particle size on baking quality and other flour attributes. Cereal Foods World 33 (5): 429-433, 1988.
- Barber, S. Benedito de Barber, C. Y LLácer M.D. Contenido de fibra dietética, atributos sensoriales de calidad y composición química del pan «integral» del comercio. Rev. Agroquim. Technol. Aliment. 23(1): 119-131, 1983.
- Ranhotra, G. Gelroth. J. Soluble and Total Dietary Fiber in White Bread Cereal Chem. 65(2): 155-156, 1988.
- Englyst, H.N y Cummings, J.H. Resistant starch a «new» food component: A classification of starch for nutritional purposes. En: Cereals in European Context. Eur. Congr. Food Sc. Technol., 1st, Bournemouth, England, July, 1987.

Recibido: 14-10-1994

Aceptado: 11-10-1995

Desarrollo de un picadillo de humedad intermedia para ancianos con base en soya texturizada

Josefina C. Morales de León, Patricia Cecin Salomón y Ma. de la Luz Crail Chávez

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F.

RESUMEN. Debido a que la nutrición juega un papel muy importante en la velocidad del envejecimiento, es posible inferir que la dieta puede mejorar y ayudar, hasta cierto punto, al bienestar de los ancianos. Con base en ello y aprovechando las experiencias de la tecnología de alimentos, se tomó en consideración para el presente proyecto elaborar un alimento de bajo costo y de fácil preparación y conservación que se adapte a los gustos y necesidades de la población senil. El objetivo planteado fue elaborar un alimento de humedad intermedia (AHI) con base en soya texturizada y verduras cocidas como la papa, la zanahoria y el chícharo, adicionado de agentes humectantes y micostáticos de acuerdo a los métodos de infusión húmeda y seca. A una parte de la formulación se le adicionó tocino frito con el objeto de que la población senil evaluara la aceptación sensorial del producto con y sin tocino y por otro lado, observar su efecto en la reducción de la actividad de agua (a_w). La a_w del picadillo con tocino fue de 0.859 y la del picadillo sin tocino fue de 0.986. El picadillo con tocino aportó el 20% de las recomendaciones para proteína, vitamina A y tiamina. Ambas formulaciones presentaron una aceptación sensorial mayor del 80% y fueron microbiológicamente estables por 8 semanas de almacenamiento a 25°C y 55% de HR en empaques flexibles de poliéster/polietileno y celofán/aluminio/polietileno. De este estudio se concluyó que los alimentos de humedad intermedia podrían ser una buena alternativa para ayudar a mejorar y diversificar la dieta de los ancianos.

SUMMARY. Development of an intermediate moisture product based on texturized soy protein for the elderly people. In accordance with the fact the aging process is closely related to the individual nutrition, it is possible to infer that the daily diet could help and improve, to a certain degree, to the elderly well-being. Based on this and making use of the food technology expertise, the development of a low cost, easily prepared and preserved product, in accordance with the taste and needs of the elderly people was considered. The objective of this project was to elaborate an intermediate moisture food (IMF) based on texturized soy protein with carrots, potatoes and peas, adding humectants and micostatic agents according to the moist and dry infusion methods. Fried bacon was added to some formulas in order to evaluate the sensorial preference of the product with and without bacon by elderly people and effect of the bacon on the water activity (a_w) reduction. The a_w for the product with added bacon was 0.859 and 0.896 for the one with no added bacon. The product with added bacon allowed 20% of the nutritional requirements of the elderly people of protein, vitamin A and thiamine. Both formulas were equally highly accepted by the elderly people (80%) and were microbiologically stable for 8 weeks period at 25°C and 55% RH in aluminium/cellophane/polyethylene and polyester/polyethylene flexible packages. We can conclude that IMF may be an alternative to improve the diet of the elderly people.

INTRODUCCION

El envejecimiento es un proceso endógeno, deletéreo, intrínseco, universal e irreversible, determinado por la acción del tiempo que conduce a diversos cambios morfológicos que se vuelven perceptibles después de la madurez y que concluyen invariablemente con la muerte (1). El envejecimiento está íntimamente relacionado, entre otros factores, con la nutrición del individuo. La modificación de los hábitos alimentarios ayuda a prevenir y atenuar la evolución de las enfermedades y mejora sensiblemente el estado nutricional de las personas. Con

esta base y considerando que las proyecciones demográficas en México señalan que el número de personas mayores de 60 años para el año 2000 llegará a representar el 7.2% del total de la población y su esperanza de vida será de 70 años, el INNSZ, a través del Depto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos, realizó en 1988 una encuesta en 14 asilos ubicados en la zona metropolitana del D.F, con el objeto de conocer el tipo de dieta que consumen los ancianos, su preferencia hacia los alimentos y los factores que en un momento dado pueden limitar el consumo de los mismos (2). De los resultados de estas se destaca que entre los alimentos que los ancianos prefieren

consumir se encuentran los platillos preparados con cereales, verduras y carne. Sin embargo, con frecuencia estos platillos son rechazados, entre otras razones, por la mala calidad culinaria y la pobre presentación de los mismos. Entre los alimentos que les sirven con mayor frecuencia en los asilos estudiados en esta investigación se encuentran: el pollo, el arroz y la leche; esto les provoca aburrimiento e incluso falta de interés por la comida. El chile y los frijoles son dos de los alimentos que más problemas les ocasionan ya que les causan irritación y flatulencia respectivamente.

La población senil entrevistada mostró diversas alteraciones físicas como son: la falta de dientes, el estreñimiento y la disminución de sus capacidades sensoriales, lo que influye notablemente en el estado nutricional del anciano. Los resultados de esta investigación permitieron orientar el tipo de producto que podría desarrollarse para atender, a nivel asilos, a este sector de la población (2).

Aprovechando la experiencia de la tecnología de alimentos, se propuso elaborar un alimento tipo picadillo de humedad intermedia. Los alimentos de humedad intermedia (AHI) se han definido como productos cuya a_w es menor con respecto a la propia del alimento fresco o del conjunto de los ingredientes que lo componen cuando se trata de una formulación; son estables sin necesidad de refrigeración y se consumen como tal o bien después de una preparación culinaria convencional; su vida útil es más prolongada con respecto a la del alimento fresco del cual proviene; su a_w varía de 0.60 a 0.90 con un contenido de humedad del 20 al 50% y se obtienen mediante una tecnología sencilla y de bajo costo (3,4).

La importancia de la tecnología utilizada para la obtención de AHI radica en el uso de aditivos y tratamientos térmicos leves, como métodos de conservación de bajo costo, alternativos a la refrigeración, a la congelación, al enlatado, etc. que permiten mantener la calidad del producto durante el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente (3,5).

Por lo anterior se puede decir que estos productos resultarían una alternativa útil para atender grupos sociales con necesidades nutricias específicas como son las personas de la tercera edad. Con base en esto, se estableció el objetivo del presente trabajo el cual fue: elaborar un alimento de humedad intermedia a partir de soya texturizada acorde a los gustos y necesidades nutricias de las personas de la tercera edad que proporcione el 20% de las recomendaciones (6,7) de proteína, lípidos, hidratos de carbono y de ser posible de vitaminas (A, B₁, B₂ y C) para este grupo de la población.

MATERIAL Y METODOS

Materias primas

Para este proyecto se utilizó soya texturizada con un contenido de proteína del 55% en base seca (8); verduras cocidas, se seleccionó la papa (*Solanum tuberosum*), la zanahoria (*Daucus carota*) y el chícharo (*Pisum sativum*) por la

preferencia que los ancianos mostraron por estos alimentos (2); reactivos (grado alimenticio) con los cuales se prepararon las diferentes soluciones de infusión: glicerol, sorbitol y saborizante de carne, particularmente un hidrolizado comercial de proteína vegetal, como principales agentes depresores de la a_w ; tocino el cual se adicionó a la formulación como agente adicional depresor de la a_w y para mejorar el sabor y las propiedades nutricias del producto; ácido fosfórico como depresor del pH y sorbato de potasio como agente antimicrobiano; empaques laminados: poliéster/polietileno (polivac) y celofán/aluminio/polietileno (celopolifol).

Desarrollo experimental

Se determinaron las proporciones de soya texturizada y verduras a utilizar tomando en cuenta los estudios realizados por Dehesa y Braverman (8) utilizando el 60% de soya texturizada hidratada y el 40% de verduras cocidas. Para el desarrollo del AHI se siguieron las recomendaciones de Díaz y Castro (9) y de Santillan y Morales (10) y se aplicaron los métodos de infusión húmeda y seca. Se utilizó una solución de infusión la cual se componía de: 10% de glicerol, 5.5% de sorbitol, 0.5% de ácido fosfórico, 0.25% de sorbato de potasio, 18.75% de saborizante de carne y 65% de agua.

Se propusieron 5 alternativas para la elaboración del producto de humedad intermedia; en todas ellas las verduras se pelaron, se lavaron y se cortaron manualmente. Posteriormente se sometieron a un proceso de cocción a vapor a presión atmosférica. El tiempo de cocción se estableció tomando como referencia algunos datos establecidos en la bibliografía (11) y fue de 20 a 30 min para 500 g de verduras. Para la rehidratación de la soya texturizada se siguieron las indicaciones que se señalan en el empaque del producto, el cual recomienda remojar la soya texturizada en agua caliente (70°C) durante 20 min. Las variantes entre cada una de las 5 alternativas propuestas fueron:

1. Las verduras cocidas y la soya texturizada hidratada se sumergieron simultáneamente en la solución de infusión, durante 15 min a 60°C, drenándose la solución posteriormente.
2. La soya texturizada seca se sumergió en la solución de infusión y se dejó reposar 15 min a 60°C, posteriormente se drenó la solución y la soya texturizada hidratada se mezcló con las verduras cocidas.
3. La soya texturizada seca se sumergió en esta solución de infusión durante 20 min a 20°C para su rehidratación, posteriormente se adicionaron las verduras cocidas y la mezcla se sometió a un segundo calentamiento (15 min a 60°C) después del cual se drenó la solución.
4. Las verduras cocidas y la soya texturizada seca, se sumergieron por separado en la solución de infusión y se dejaron reposar 15 min a 60°C, se drenaron ambas soluciones y posteriormente las verduras y la soya se mezclaron manualmente.

5. La inmersión se llevó a cabo de la misma manera que en la alternativa 4, pero en este caso la soya texturizada se hidrató en agua 20 min a 70°C previamente a su inmersión en la solución de agentes humectantes.

Una vez obtenidos los productos de las diferentes alternativas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se empacaron en los envases de celopolial y polivac en porciones de 100 g y se almacenaron a 25°C y 55% de HR.

Con base en la aceptación sensorial y en los niveles de a_w se seleccionó una de las 5 alternativas propuestas para la elaboración del AHI. Al picadillo obtenido finalmente se le adicionó tocino frito en un 10% del total del producto (soya texturizada hidratada y verduras cocidas) obteniéndose así dos AHI: uno con tocino frito y otro sin tocino.

Métodos de análisis

Los análisis a los que se sometieron las materias primas y los picadillos de humedad intermedia con y sin tocino son los siguientes: análisis químico proximal de acuerdo a las técnicas oficiales del AOAC (12) en las que se incluye: humedad, cenizas, proteína, grasa cruda, fibra cruda e hidratos de carbono; análisis de vitaminas; vitaminas A por HPLC (13), vitamina B₁ y vitamina B₂ por métodos fluorométricos (14), vitamina C por titulación (12); determinación del índice de peróxidos, como rancidez (12); análisis microbiológico de acuerdo a las técnicas recomendadas por la Secretaría de Salud (México) (15), en las que se incluyen: cuenta de bacterias mesófilas aerobias (ufc/g), cuenta de mohos y levaduras (ufc/g), enumeración de coliformes totales y fecales, investigación de *Salmonella sp.* en 25g, cuenta de *Staphylococcus aureus* (ufc/g); actividad de agua por el método del higrómetro eléctrico Novasina DAL-20 (16); pH de acuerdo a las técnicas del manual del potenciómetro ORION RESEARCH (17); evaluaciones sensoriales las cuales se realizaron en dos etapas (18):

1. A nivel laboratorio. Se evaluaron los productos sin guisar y guisados con una salsa de jitomate elaborada a base de cebolla, ajo, pimienta y jitomate. Participaron 30 jueces no entrenados a los cuales se les aplicó una prueba de nivel de agrado con escala hedónica de 7 puntos. De los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de aceptación y la preferencia de cada producto.
2. A nivel de asilos. Se degustaron los platillos guisados con salsa de jitomate. se aplicó una prueba de aceptación, donde se pidió al juez que diera su opinión acerca del producto. Se seleccionaron 4 asilos de nivel socioeconómico medio y bajo ubicados en la zona metropolitana del D.F. Participaron como jueces 65 personas mayores de 60 años que gozaban de buena salud y que pudieron dar su opinión acerca del producto que estaban evaluando.

Vida de anaquel

Los picadillos con y sin tocino ya empacados, se almacenaron durante dos meses en una cámara de temperatura y humedad controladas a 25°C y 55% de HR. Simultáneamente se almacenó como testigo el producto sin empaque. Durante el almacenamiento se tomaron muestras al azar, al inicio, cada 8 días y al final del período de almacenamiento, las cuales se sometieron a un análisis químico (12), se les determinó la cuenta de bacterias mesófilas aerobias (15), índice de peróxidos (12), vitaminas (12,13,14) a_w (16) y evaluaciones sensoriales (18). Los criterios que se tomaron para establecer el periodo de vida útil de los picadillos de humedad intermedia fueron los siguientes: que no presentaran un desarrollo de BMA mayor a 100 000 000 ufc/g; que la a_w no fuera menor de 0.80 ni mayor de 0.90 para este tipo de productos; que presentaran una aceptación sensorial de por lo menos el 80% de los jueces.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los resultados de análisis químico y físico de las materias primas, cabe mencionar, como era de esperarse, el bajo contenido de humedad (8.5 g/100g) y de a_w (0.3) de la soya texturizada y su contenido de proteína (45.5 g/100g) la cual se considera como una proteína vegetal de buena calidad. Por otro lado, el alto porcentaje de humedad de la papa (80.4 g/100g), de la zanahoria (89.5 g/100g) y del chícharo (76.7 g/100g), no contribuyen a la reducción de la a_w del producto para obtener un AHI. El tocino proporciona proteína y un porcentaje de grasa (20.3 g/100g y 45.6 g/100g respectivamente) que ayudan a mejorar las características nutricias, físicas y sensoriales del producto; por otro lado, su bajo contenido de humedad (29.5 g/100g) y su contenido de sodio (76 mg/100) contribuyen a la reducción de la a_w . La sal disminuye la a_w por su efecto como soluto en el agua del producto, la grasa del tocino actúa indirectamente reduciendo la humedad del producto, provocando así que los solutos añadidos (la sal entre ellos) se disuelven en una cantidad de agua menor alcanzándose una concentración mayor y una reducción adicional de la a_w .

De las cinco alternativas propuestas para el desarrollo del alimento de humedad intermedia se seleccionó la tercera (Figura N°1) ya que con esta se obtuvo un picadillo con un valor de a_w de 0.750, a_w que se encuentra dentro de los límites establecidos para AHI. Sin embargo en el producto se percibían notas de sabor a soya ligeramente ácidas, algunas de ellas provocadas probablemente por el saborizante de carne, que tiene un pH de 4.6. Por ello se modificó la concentración de este saborizante en la solución, variándolo arbitrariamente de 18.75g a 7.75 g (Tabla 1) ajustándola a 100 con agua. A los productos obtenidos en cada caso se les determinó la a_w y se sometieron a evaluaciones sensoriales. De los resultados obtenidos se seleccionó la solución denominada como "F" en la Tabla 1. Pese a que con todas las soluciones propuestas se

TABLA 3
FORMULA SELECCIONADA PARA LA
ELABORACION DE LOS PICADILLOS DE
HUMEDAD INTERMEDIA

COMPONENTES	CON TOCINO (g)	SIN TOCINO (g)
Soya texturizada*	17.00	17.00
Verduras cocidas	36.00	46.00
Tocino frito	10.00	—
Agua	76.00	76.00
Glicerol	10.00	10.00
Sorbitol	5.50	5.50
Saborizante de carne	7.75	7.75
Acido fosfórico	0.50	0.50
Sorbato de potasio	0.25	0.25
Actividad de agua	0.859	0.896
Características sensoriales	Sabor y apariencias agradables consistencia suave	Sabor y apariencia agradables consistencia suave

*17 de soya texturizada seca = 54g de soya texturizada hidratada

TABLA 4
COMPOSICION QUIMICA DE LOS PICADILLOS
Y PORCENTAJE EN QUE CUBREN LAS RECOMENDACIONES
DIARIAS

ANALISIS	RECOMENDACIONES*	PICADILLO CON TOCINO		PICADILLO SIN TOCINO	
		Composición en 100g	Cantidad que cubre de la recomendación (%)	Composición en 100g	Cantidad que cubre de la recomendación (%)
Energía	2200 kcal	218.1 kcal	10.0	122.6 kcal	6.0
Proteína**	66.0 g	13.1g	20.0	10.0g	15.1
Lípidos	61.0g	7.3g	12.0	0.2g	0.4
Hidratos de carbono***	346.5g	25.0g	7.2	20.2g	6.0
Fibra cruda	20.0 - 30.0g	1.5g	7.5	1.0g	5.0
Humedad		48.6g		64.6g	
Cenizas		4.5g		3.9g	

* Recomendaciones diarias para las personas de la tercera edad (6,7)

** Nitrógeno x 6.25

*** Por diferencia.

El colesterol, por su naturaleza química, es un lípido y se concentra principalmente en la fracción lipídica de alimentos como el huevo, la leche, la carne y sus derivados: por ende, el tocino, que contiene grasa animal, presenta en su composición química colesterol (19.20). Las personas de la tercera edad deben evitar consumir estos productos en exceso, sin embargo en las proporciones en las que se adiciona al AHI desarrollado en este proyecto, que corresponde al 10% del total del producto, no representa un peligro para la salud del anciano, si se administra prudentemente. Este alimento está cubriendo únicamente el 12% de la recomendación diaria de lípidos para las personas de la tercera edad, además de que no es el único alimento que el anciano va a consumir diariamente.

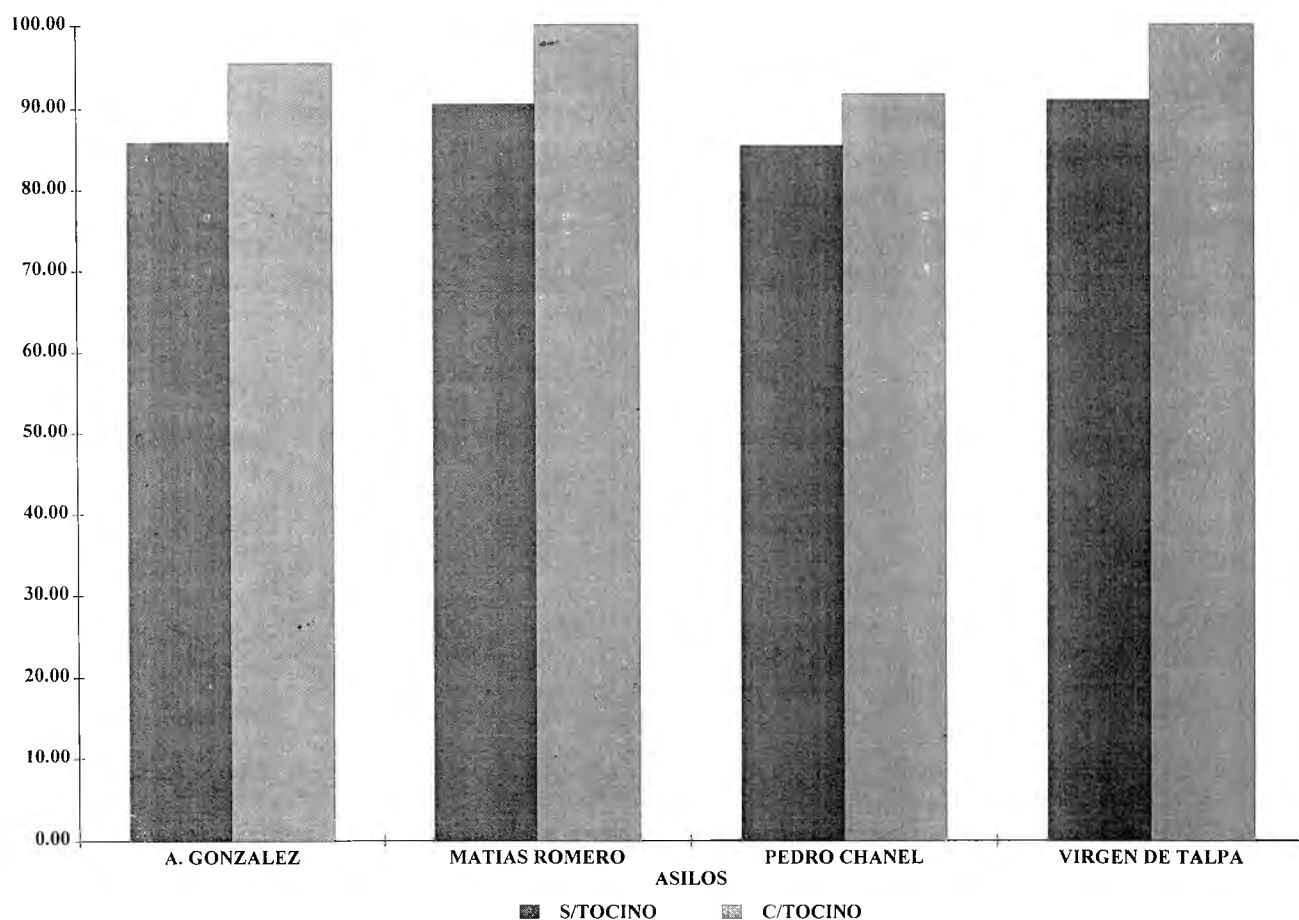
En cuanto al contenido de vitaminas en los picadillos con y sin tocino, se observó que el producto con tocino cubrió el 20% de las recomendaciones de vitamina A (0.20 mg/100g) y de tiamina (0.26 mg/100g), mientras que el picadillo sin tocino cubrió el 18% (0.18 mg/100g) y 16.6% (0.20 mg/100g) de la recomendación de ambas vitaminas, respectivamente. Por otro lado, los valores de riboflavina y vitamina C en ambos productos fueron muy bajos y estos cubrieron únicamente el 0.3% y 5.3% respectivamente de la recomendación para las personas de la tercera edad.

Las determinaciones de a_w de los AHI, mostraron que el picadillo con tocino tiene una a_w menor (0.859) que el picadillo sin tocino (0.896), con lo cual se confirma la acción depresora que ejerce el tocino sobre la a_w del producto; sin embargo ambos productos se encontraron dentro de los límites establecidos para AHI (0.6 - 0.9). Así mismo, el pH fue ligeramente ácido (5.2) en ambos picadillos, lo que contribuyó a la estabilidad microbiológica de los productos (3).

El análisis microbiológico de los AHI indicó que no hubo desarrollo de microorganismos. Esto pudo deberse a que a dichos niveles de a_w se inhibe el desarrollo de bacterias mesófilas aerobias en general y a que el sorbato de potasio actúa como agente micótico y detiene el desarrollo de mohos y levaduras, además del efecto térmico del proceso y de las condiciones higiénicas en las que se elaboraron, por lo que se puede decir que estos productos son aptos para el consumo humano.

Las evaluaciones sensoriales realizadas a nivel laboratorio indicaron que el producto de mayor aceptación fue el picadillo con tocino y guisado con salsa de jitomate, para el cual, el 93.3% de los jueces dió una calificación de 7 (gusta mucho), mientras que el picadillo con tocino y sin guisar fue aceptado por el 80% de los jueces con una calificación de 6 (gusta moderadamente). Por otro lado, el picadillo sin tocino, con y sin salsa de jitomate solo fue aceptado por el 20% de los jueces con una calificación de 4 (no gusta ni disgusta). De las evaluaciones sensoriales, de los productos de humedad intermedia con y sin tocino, guisados con salsa de jitomate, realizadas en los asilos seleccionados, se observó que el picadillo con tocino guisado fue aceptado por el 93% de los jueces, mientras que el picadillo sin tocino guisado tuvo una aceptación promedio del 88% (Fig. N° 2), por lo que se puede decir que ambos picadillos son bien aceptados por los ancianos y por lo tanto podrían ser una buena alternativa para diversificar la dieta de las personas de la tercera edad a nivel de asilos.

FIGURA 2
Aceptación de los picadillos de humedad intermedia en los asilos



Durante las 8 semanas en las que se mantuvieron en almacenamiento los AHI desarrollados, se observó que los valores de pH, vitaminas y composición química permanecieron prácticamente constantes en los productos empacados. La cuenta de bacterias mesófilas aerobias (BMA), presentó un total de 100 ufc/g en el picadillo sin tocino y de 2000 ufc/g en el picadillo con tocino; no se tiene una norma oficial para este tipo de productos, pero si se toma como punto de comparación la norma establecida para la carne molida de res adicionada de proteína vegetal, en la que se establece un desarrollo máximo de BMA de 100 000 000 ufc/g, se puede decir que los productos empacados son aptos para el consumo humano aún después de dos meses de almacenamiento a 25°C y 55% de HR. Los valores de a_w se incrementaron ligeramente de 0.896 a 0.899 para el picadillo sin tocino y de 0.859 a 0.867 para el picadillo con tocino, sin embargo no se rebasaron los límites permitidos para los AHI. Los valores de peróxidos aumentaron gradualmente (de 16 a 22 meq/Kg de producto para el picadillo sin tocino y de 18 a 29 meq/Kg de producto para el picadillo con tocino), pese a esto, en las pruebas sensoriales no

se detectó rancidez en el olor ni en el sabor de los productos. Los resultados de las evaluaciones sensoriales mostraron que ambos productos fueron aceptados únicamente por el 20% de los jueces ya que presentaron visualmente una coloración pálida, ligeramente blancuzca y un sabor desagradable con notas amargas. Con base en estos resultados, se detuvo el periodo de almacenamiento de los picadillos empacados a ese tiempo.

Los picadillos utilizados como testigos (sin empaque), a los 15 días de almacenamiento, no presentaron desarrollo bacteriano, sin embargo sufrieron una deshidratación con la cual se alcanzaron valores de humedad hasta de 9 g/100g y de a_w de 0.3, similares a las de un producto seco; los valores de peróxidos disminuyeron de 16 a 9 meq/Kg de producto y sus propiedades sensoriales se modificaron drásticamente presentando una textura muy dura y una apariencia desagradable, por lo que dichos productos se eliminaron del estudio a ese tiempo.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que es posible utilizar los conceptos de reducción de la a_w por método combinados para la obtención de productos tipo picadillo, con base en soya texturizada y verduras cocidas, de humedad intermedia, con la adición o no de tocino frito, el cual ejerce una acción depresora de la actividad de agua sobre el producto debido a su bajo contenido de humedad y su alto contenido de sodio. Dichos productos pueden ser incluidos en la dieta de las personas de la tercera edad ya que presentaron una aceptación sensorial mayor del 80% en los asilos evaluados, como una alternativa útil para atender sus necesidades nutricias.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los directivos de los asilos estudiados, por el apoyo brindado para la realización de las evaluaciones sensoriales de los productos y al personal del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, en el Depto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos a Ma. Lorena Cassis N., Ma. de la Luz Colón H., Hortensia Villavicencio, Silvia Ruíz, Elizabeth Hernández y Ma. del Pilar Mercado, por su apoyo en los análisis realizados a los productos.

REFERENCIAS

- González A.J. Conceptos fundamentales del envejecimiento. Prescripción médica. 12:1. 1989.
- Crail Ch, M.L. y Morales L.j. Estudio sobre diversos aspectos físicos, dietéticos y socioeconómicos de los ancianos que residen en casa de reposo del D.F. Revista Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Medicina, Ciencia, Técnica y Humanismo. 4: 22 - 29, 1990.
- Scorza O.C., Chirife J., Cattaneo P., Virgo M.S., Bertoni M.N. y Sarrailh P. Factores que condicionan el crecimiento microbiano en alimentos de humedad intermedia. La Alimentación Latinoamericana. Argentina, 1981.
- Villar T., Silveira C y Chirife J. Hacia una actualización del concepto de alimentos de humedad intermedia. En: Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. V Centenario, Información Técnica No. 1 CYTED-D. México 1987.
- Aguilera R.J., Bornhardt B.C., Cabello P.J., Morales L.J. y Santillan D.M. Utilización de métodos combinados para la preservación de pulpa de pescado. Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. V Centenario. CYTED-D. Subprograma tratamiento y conservación de alimentos. México. 1989.
- Bidlack Kirsh and Meskin. Nutrition and the elderly nutritional requirements. Food Tech. 40(2):61,1986.
- Geige E. y Bavetto A. Necesidades nutricias en el anciano. En: Cuidado del paciente geriátrico. Cowary V. Ed. Científicas la Prensa Médica Mexicana. México, 1962.p 147.
- Dehesa S y Braverman V. La soya y sus productos. Cuadernos de Nutrición. 12(3):44. México, 1989.
- Díaz G. y Castro E Métodos y tecnologías para la producción de productos de humedad intermedia. En: Programas de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. V Centenario. CYTED-D. Información Técnica No. 1 p.38 - 51, 1987.
- Santillan D.M. y Morales L.J. Elaboración de un producto tipo hamburguesa con base en carpa a través de la reducción de la actividad acuosa. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 42(2):173 - 179, 1972.
- Kotschevar A.J. Vegetable cookery. Standars, principles and techniques in quantity food production. USA, Ed. Canhers book. p. 309 - 312. 1989.
- Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. AOAC. 15th ed. Washington, D.C. 1990.
- Deustsch M. Vitamins and other nutrients (Vit. A, E and B Carotene in foods) AOAC. 1989.
- Approved Methods of the American Association of Cereals Chemists. AACC. 8th ed. Min., USA. 1986.
- Secretaría de Salubridad y Asistencia. Subsecretaría de Salubridad. Técnicas generales para el análisis microbiológico de alimentos. Dirección General de Laboratorios de Salud Pública. México, 1979.
- Manual del determinador de actividad acuosa (higrómetro eléctrico) «Novasina» DAL-20, con sensor novasina Ag - pp. 1985.
- Manual de potenciómetro ORION - RESEARCH, modelo 601 - A/digital IONALYSER. 1984.
- Pedrero;D.L. y Pangborn, R.M. Evaluación Sensorial de los Alimentos. Métodos analíticos. Ed. Alhambra Mexicana. México, D.F. 1989.
- Bourges,R.H: Arteroesclerosis, Colesterol y Dieta. Cuadernos de Nutrición. 7(5):17-32. 1984.
- Casanueva,E. Nutrición y Senectud. Cuadernos de Nutrición. 8(1):17-32. 1985.

Recibido: 20-01-1995

Aceptado: 25-09-1995

Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

Helena T. Godoy¹, and Delia B. Rodriguez Amaya²

Departamento de Ciencia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, SP., Brasil.

SUMMARY. Six sample lots of loquat commercialized in Campinas, Brazil were analyzed for their carotenoid composition β -carotene (7.8 $\mu\text{g/g}$), ζ -carotene (0.1 $\mu\text{g/g}$), neurosporene (1.1 $\mu\text{g/g}$), β -cryptoxanthin (4.8 $\mu\text{g/g}$), 5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin (0.6 $\mu\text{g/g}$), violaxanthin (1.6 $\mu\text{g/g}$), neoxanthin (0.8 $\mu\text{g/g}$) and auroxanthin (0.9 $\mu\text{g/g}$) were identified. β -Carotene and β -cryptoxanthin were the principal pigments, being responsible for 44% and 27%, respectively, of the total carotenoid content (17.6 $\mu\text{g/g}$). Both were also the principal contributors to the vitamin A value of 175 RE/100g. The carotenoid composition of the Brazilian loquat resembles that of the Japanese loquat variety Tanaka.

RESUMEN. Contenido de carotenoides y vitamina A en níspero brasileño. Se analizó el contenido de carotenoides en seis lotes de muestras de níspero comercializadas en Campinas, Brasil. Se identificaron el β -caroteno (7.8 $\mu\text{g/g}$), ζ -caroteno (0.1 $\mu\text{g/g}$), neurosporeno (1.1 $\mu\text{g/g}$), β -criptoxantina (4.8 $\mu\text{g/g}$), 5,6-monoepoxy- β -criptoxantina (0.6 $\mu\text{g/g}$), violaxantina (1.6 $\mu\text{g/g}$), neoxantina (0.8 $\mu\text{g/g}$) y auroxantina (0.9 $\mu\text{g/g}$). El β -caroteno y la β -criptoxantina fueron los principales pigmentos, siendo responsables por 44 y 27%, respectivamente, del contenido total de carotenoides (17.6 $\mu\text{g/g}$). Ambos fueron también los principales contribuyentes para el valor de vitamina A de 175 ER/100 g. La composición en carotenoides del níspero brasileño se asemeja al del níspero japonés variedad de Tanaka.

INTRODUCTION

A native of China, loquat (*Eriobotrya japonica* (Thumb.) Lindl.) is a yellow orange to golden orange sub-tropical fruit. Also known as Japanese plum, it has been grown for years in that country and is also cultivated in Israel and other sub-tropical regions. The plant belong to the family Rosaceae, sub-family Maloideae. The fruits appear in clusters, are ovoid or pyriform, about 4 cm long and contain a few large ovoid brown seeds (1).

Although the carotenoid composition of loquat had already been determined in Israel (2) and Japan (3,4), the inherent variability of food samples as a function of factors, such as

varietal differences and geographic or climatic effects, justifies the analysis of loquats produced in other countries.

In Brazil, loquat has acquired increasing economic importance in recent years. Its harvest season coincides with the period (May to October) in which other fresh fruits are scarce in the domestic market. Brazilian loquat has also found its way into the international market, being one of the fresh fruits exported by the country. According to Ojima and Kigitano (5) the major varieties are «Mizuho», which is a cross between the Japanese varieties Kusunoki and Tanaka, and «Precoce», which is a cross between Tanaka and Mogi

Carotenoids have gained renewed interest in recent years. In terms of their nutritional and technological importance, the emphasis has been for many years on the provitamins and the major pigments responsible for food color. Recent studies showing that the carotenoids, vitamin A active or not, may perform other important physiological functions, such as inhibition of cancer (6-10), immunoenhancement (11) and prevention of cardiovascular disease (12) demonstrate the importance of determining the complete composition.

1 Assistant Professor, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, Campinas, SP, Brasil.

2 Full Professor, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, Campinas, SP, Brasil.

MATERIALS AND METHODS

Samples: The samples were obtained from supermarkets and the farmer's market in the Campinas region. It was not possible to establish the variety, but it was probably Mizuho and/or Precoce, the most produced varieties. The fruits were medium sized, almost 50 g each, oval, yellow-orange, with easily removed peel, firm pulp, sweet to slightly acid taste. Lots of approximately 500 g were collected during the season. The fruits of each lot were peeled and homogenized, 150 g pulp was taken for analysis.

Analytical methodology: The carotenoid composition was determined as described in detail previously (13), with some modifications to make it more suitable to the sample being analysed. The pigments were extracted in a Waring blender with cold acetone, MgCO₃ and celite and filtered through a Buchner funnel, extraction and filtration being repeated until the residue turned colorless. The acetone extracts were combined and the carotenoids transferred to petroleum ether in a separatory funnel with the addition of water. The epiphase was washed 4 or 5 times with water to get rid of residual acetone. Saponification was undertaken with equal volume of 10% KOH in methanol with approximately 0.1 g of BHT, at room temperature overnight. After washing and concentration in a rotary evaporator, initial separation was accomplished in a MgO: Hyflosupercel (1:2) column developed with 4% diethyl ether and increasing concentration of acetone (10, 15 and 20%) in petroleum ether.

The much higher amounts of β -carotene and β -cryptoxanthin made the separation more difficult. The first two fractions were rechromatographed on neutral alumina columns (act II or III) to separate β -carotene and ζ -carotene of the first fraction and neurosporene, β -cryptoxanthin and 5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin of the second fraction. The epoxides violaxanthin, auroxanthin and neoxanthin (fraction 3) could only be separated completely on silica gel plates developed with 20% acetone in petroleum ether. The β -carotene and β -cryptoxanthin fractions were submitted to rechromatography on Ca(OH)₂ (Mallinkrodt) column to verify the presence of *cis* isomers.

Identification was based on chromatographic behavior on column and TLC, visible absorption spectra and specific chemical reactions (epoxide test, *cis-trans* isomerization, acetylation and methylation) (14). Quantitation was based on the maximum absorbance as described by Davies (14).

The vitamin A value was calculated according to the NAS-NRC (15) ratio of 6 μ g β -carotene and 12 μ g of the other provitamins to 1 retinol equivalent (RE).

Necessary precautions were taken to prevent degradation or alteration of pigments during analysis (e.g protection from light and high temperature, short analysis time).

RESULTS AND DISCUSSION

Confirmation of the identity of the carotenoids: Eight carotenoids were detected in the Brazilian loquat. The carotenes, β -carotene ($\lambda_{\text{máx}}$ 477, 450 and shoulder at 424 nm), ζ -carotene ($\lambda_{\text{máx}}$ 424, 400, 380 nm) (and neurosporene ($\lambda_{\text{máx}}$ 472, 442, 420 nm), were identified through their typical absorption spectra in petroleum ether. The absence of substituents, already indicated by the order of elution from the column, was confirmed on the silica gel plates developed with 3% methanol in benzene where the carotenes run with the solvent front.

The xanthophylls, β -cryptoxanthin ($\lambda_{\text{máx}}$ 478, 450, and shoulder at 425 nm), 5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin ($\lambda_{\text{máx}}$ 472, 444, 420 nm), violaxanthin ($\lambda_{\text{máx}}$ 470, 445, 420 nm) auroxanthin ($\lambda_{\text{máx}}$ 428, 405, 384 nm) and neoxanthin ($\lambda_{\text{máx}}$ 468, 438, 422 nm), presented absorption spectra compatible with their chromophores. The presence of hydroxyl groups was first indicated by the R_f values on the silica gel plates (0.49, 0.48, 0.15, 0.09 and origin, respectively) and confirmed by the positive response to acetylation with acetic anhydride. Reaction to methylation with acidified methanol, however, was negative, demonstrating that the hydroxy substituents were not located in allylic positions. The occurrence of epoxide groups was first shown by the transformation of the yellow colour to blue or green on exposure of the silica plates to HCl vapor. Its location at the 5,6-position in neoxanthin and 5,6- and 5',6'-positions in violaxanthin was confirmed by a 20 nm and 40 nm hypsochromic shift, respectively, on addition of 0.1N HCl to the pigment dissolved in ethanol. The presence of furanoid groups at the 5,8- and 5',8'-positions in auroxanthin was shown by the absorption spectrum with maxima already 40 nm lower than β -carotene. *Cis*-isomers of β -carotene and β -cryptoxanthin were not detected.

Quantitative Composition: Table 1 shows the quantitative composition. β -Carotene (7.8 μ g/g) was the principal pigment and β -cryptoxanthin (4.8 μ g/g) appeared to be the second major carotenoid. The mean total carotenoid content was 17.6 μ g/g and the vitamin A value was 175 RE/100 g or 1750 IU/100 g. The provitamins A were β -carotene, β -cryptoxanthin and 5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin.

The carotenoid composition is presented in percentages in Table 2 so as to permit comparison with the data for Israeli Golden Nugget (2) and Japanese Mogi and Tanaka loquats (3). The Israeli data was given in percentages while the Japanese results were expressed in both μ g/100g and percentages. In both studies, the number of sample lots analysed was not specified and no idea of between-sample variation was given.

TABLE 1
CAROTENOID COMPOSITION OF THE BRAZILIAN
LOQUAT

Carotenoid	Concentration ($\mu\text{g/g}$ fresh weight) ^a		SD
	Range	Mean	
β -carotene	7.4 - 8.0	7.8	0.3
ζ -carotene	0.1 - 0.2	0.1	0.1
neurosporene	0.9 - 1.5	1.1	0.3
β -cryptoxanthin	4.6 - 5.0	4.8	0.1
5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin	0.3 - 0.9	0.6	0.2
violaxanthin	1.5 - 1.7	1.6	0.1
auraxanthin ^c	0.8 - 1.0	0.9	0.1
neoxanthin	0.6 - 0.9	0.8	0.1
Total	16.9 - 18.1	17.6	0.2
Vitamina A value (RE/100 g)	166 - 189	175	12

^a Ranges, means and standard deviations of six sample lots analyzed individually.

^b Value calculated on the basis of the β -cryptoxanthin absorption coefficient.

^c Value calculated on the basis of the β -carotene absorption coefficient. The carotenoids were in trans- configuration.

TABLE 2
COMPARISON OF THE CAROTENOID RELATIVE
PERCENTAGENS IN BRAZILIAN, ISRAELI AND
JAPANESE LOQUAT

Carotenoid	% of total Carotenoid		
	Brazilian	Israeli ^a Var. Golden Nugget	Japanese ^b Var. Mogi Var. Tanaka
cis-neo- β -carotene	—	5.0	—
β -carotene	44.6	33.0	29.7
ζ -carotene	0.7	—	1.0
γ carotene	—	6.1	—
neurosporene	6.2	—	—
mutatochrome	—	1.4	0.1
5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin	3.5	2.8	—
5,6,5', 6'-diepoxy- β -cryptoxanthin	—	2.2	13.0
β -cryptoxanthin	27.3	22.0	32.8
cryptoflavin	—	1.6	—
lutein	—	3.2	—
cis-lutein	—	0.7	—
isolutein	—	1.7	—
violaxanthin	8,8	2,9	8,2
crysantemaxanthin	—	0,9	—
luteoxanthin	—	1,4	—
neochrome	—	1,0	—
neoxanthin	4,3	4,9	5,9
auraxanthin	4,9	—	—
Total carotenoid content ($\mu\text{g/g}$)	17.6	22.0	16.8
Vitamina A (RE/100g)	175	210	136

^a Gross J, Gabai M. & Lifshitz A. (2) also reported 0.5% unknown (a+b), 5.5% carbonyl, 1.6% β -carotene-like, 0.9% cryptoxanthin epoxyfuranoid and 0.2% neoxanthin-like. The authors also quantified phytofluene (0.5%).

^b Kobayashi K., Iso H., Nishiyama K. & Akuts S. (3) also reported 5,6,5',8'-diepoxy- β cryptoxanthin, an unknown and phytofluene and 6 more pigments present at percentages lower than 0.1%.

There was excellent agreement between the Brazilian and Japanese (variety Tanaka) loquats especially in terms of β -carotene (7.8 vs 7.0 $\mu\text{g/g}$), β -cryptoxanthin (4.8 vs 5.2 $\mu\text{g/g}$) and violaxanthin (1.6 vs 1.3 $\mu\text{g/g}$). This is to be expected since, as mentioned earlier, the seeds of the loquats grown in Brazil come from Japan and are probably of the Tanaka or a cross with the Tanaka variety. Geographic effects appeared to be not important. The Brazilian fruit also contained neurosporene while the Japanese loquat had 5,6,5', 6' - diepoxy- β -cryptoxanthin instead.

The Israeli loquat presented a somewhat different pattern, although β -carotene and β -cryptoxanthin were also the major carotenoids. Notably 6.1% γ -carotene and 3.2% lutein were found and, in addition, a series of epoxides and cis-neo- β -carotene.

The cis-neo- β -carotene (5%) detected in the Israeli loquat was not reported in the Japanese fruit. In Brazilian loquat a trace of 13-cis- β -carotene was found only in one sample.

The Japanese workers found the epoxides mutatochrome, cryptoflavin, auraxanthin, cryptochrome and diol or triol 5,8-monoepoxides only in the canned loquat fruit stored for 6 months (16).

The total carotenoid content and vitamin A value of the Brazilian fruit (17.6 $\mu\text{g/g}$ and 175 RE/100 g) were similar to the Japanese Tanaka variety (20.8 $\mu\text{g/g}$ and 180 RE/100 g) and slightly lower than the Israeli Golden Nugget loquat (22.0 $\mu\text{g/g}$ and 210 RE/100 g). This is reflected in the color of the fruit which is golden orange for the Israeli loquat and yellow-orange for the Brazilian fruit.

A more recent Japanese paper (4) reported much higher β -carotene (21.1 $\mu\text{g/g}$) and β -cryptoxanthin (9.6 $\mu\text{g/g}$) contents but no violaxanthin for the Tanaka variety (yellow-orange). The total carotenoid content (38.5 $\mu\text{g/g}$) was even higher than that of the Golden Nugget Israeli loquat. The loquat variety Toi was also analyzed giving the following composition in $\mu\text{g/g}$: β -carotene (0.8), β -cryptoxanthin (1.2), cryptoflavin (0.1), lutein (0.1), antheraxanthin (trace), luteoxanthin (0.1) and neochrome (0.2). The total carotenoid content was only 2.39 $\mu\text{g/g}$.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) for the financial support.

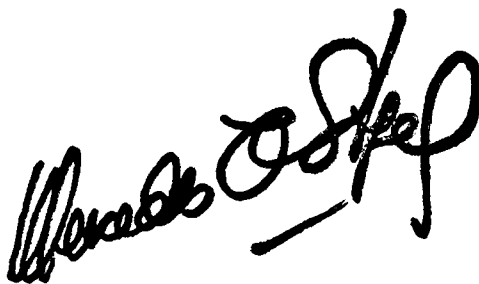
REFERENCES

1. Gross, J. Carotenoids, In: Pigments in Fruits, London, Academic Press, p. 146-17. 1971,
2. Gross, J. Gabai, M & Lifshitz, A. Carotenoids of *Eriobotrya japonica*. Phytochemistry, 12: 1775-1772, 1973.
3. Kobayashi, , Iso, H, Nishiyama, K & Akuta, S. Studies on carotenoid pigments and colour of fruits in Japan. Composition of carotenoids in loquat fruits (*Eriobotrya japonica* Lindl.). Jap Soc Food Sci Technol, 25: 191-195, 1978a.
4. Kon, M & Shimba, K. Cultivar difference of carotenoids in

- loquat fruits. *J Jap Soc Food Sci Technol*, 35: 423-429, 1988.
5. Ojima, M & Kigitano, O. *Cultura da nespereira*. *Rev Agric*, 21: 1-7, 1978.
6. Colditz, GA, Lipnick, RJ, Millett, WC, Rosner, B, Posner, BM & Hennekens, CH, Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *Am J Clin Nutr*, 41: 32-36, 1985.
7. Krinsky, NI. Carotenoids in medicine. In: *Carotenoids: Chemistry and Biology*, Krinsky, NI, Mathews-Roth, MM & Taylor, RF (Eds). New York, Plenum Press, p. 279-291, 1990.
8. Mathews-Roth, MM. Carotenoids and cancer prevention experimental and epidemiological studies. *Pure Appl Chem*, 57: 717-722, 1985.
9. Mathews-Roth, MM. Recent progress in the medical application of carotenoids. *Pure Appl Chem*, 63: 147-156, 1991.
10. Olson, JA. Biological actions of carotenoids. *J Nutr* 119: 94-95, 198.
11. Bendich, A. Carotenoids and the immune system. In: *Carotenoids: Chemistry and Biology*, Krinsky, NI, Mathews-Roth, MM/ Taylor, RF (Eds). New York, Plenum Press, p. 323-335, 1990.
12. Guster, H. Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Inter J Vit Nutr. Rer*, 61: 277-291, 1991.
13. Rodríguez, DB, Raymundo, LC, Lee, TC, Simpson, KL & Chichester, CO. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann Bot*, 40: 615-624, 1976.
14. Davies, BH. Carotenoids, In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2 nd ed, vol. 2, Goodwin, TW (Ed). London, Academic Press, p. 38-65, 1976.
15. NAS-NCR. Recommended Dietary Allowances. 10th ed., Washington, DC, National Academy of Sciences, p. 78-92, 1989.
16. Kobayashi, K, Iso, H, Nishiyama, K & Akuta, S. The relationship between carotenoid pigments and colors of fresh and canned loquat fruits (*Eriobotrya japonica Lindl.*). *J. Jap Soc Food Sci Technol*, 25: 426-430, 1978b.

Recibido: 10-10-1994

Aceptado: 25-08-1995



Notas

X CONGRESO LATINOAMERICANO DE NUTRICIONISTAS Y DIETISTAS

Declaración del Nutricionista Latinoamericano

Con ocasión del X Congreso de la Confederación Latinoamericana de Nutricionistas y Dietistas (CONFELANYD), la Asamblea de Delegados de la misma ha considerado conveniente discutir, aprobar y difundir este breve documento, que esperamos contribuya especialmente a dos finalidades: servir como marco de referencia y orientación para la labor que cotidianamente desempeñan los Colegios Profesionales, las Asociaciones y Federaciones que constituyen su membresía, y constituirse en un medio de difusión de nuestro pensamiento, ante el conjunto de las instituciones, comunidades y personas vinculadas al cuidado de la nutrición y salud del pueblo latinoamericano.

El contexto de cambios: Problemas y oportunidades

Vivimos un contexto de cambios frente a los cuales los Nutricionistas y Dietistas tenemos una doble responsabilidad. Por un lado no podemos dejar de señalar la existencia de determinados problemas y opinar sobre sus causas; por otro lado debemos ser también capaces de identificar las oportunidades, que bajo la forma de diversas potencialidades, se nos van presentando. Es por ello que consideramos conveniente manifestar lo siguiente:

1. La alimentación es un derecho básico y constituye condición fundamental para el desarrollo humano; sin embargo, la pobreza continua, formando parte del perfil de América Latina, afecta de manera sistemática a millones de personas. En este sentido el estado de nutrición es una de sus manifestaciones que refleja con mayor claridad la iniquidad.
2. El problema del hambre es obra de los seres humanos y se mantiene a pesar de que los avances de la ciencia demuestran que el hombre y la técnica tienen la capacidad necesaria para alimentar a toda la población mundial. La inseguridad alimentaria de nuestros países se debe, sobre todo, a las políticas económicas que se aplican en el plano internacional.
3. El modelo de crecimiento que actualmente prevalece en nuestras sociedades genera exclusiones y reduce los derechos sociales, no sólo para los que quedan fuera de él, sino también para un aparte de quienes están dentro del mismo. Es importante destacar que estas exclusiones y fenómenos de pobreza, marginación y violencia social, se dan también en sociedades donde existe un contexto de abundancia, lo que revela la dimensión ética del problema y nos obliga a recapacitar sobre el tipo de desarrollo que buscamos y sobre los valores que nos sirven de fundamento.
4. Altas cargas financieras de la deuda externa, proceso inflacionario exorbitante, deterioro de las relaciones de intercambio económico, con el agregado de los cambios naturales traducidos en desastres por sequía, inundaciones, etc., han impactado significativamente en la capacidad adquisitiva de la población. Las altas tasas de migración del campo a la ciudad han configurado un panorama demográfico con influencia negativa de descapitalización del sector productivo primario, el deterioro del ambiente y el aumento de la pobreza generando condiciones negativas para procurar seguridad alimentaria a miles de familias. En la última década, las políticas de ajuste económico aplicadas en varios países latinoamericanos, originan también profundos y significativos cambios en los patrones de alimentación de la población, como consecuencia de la transnacionalización de la industria alimentaria, de las formas de producción, provisión, distribución y consumo de alimentos de todos los sectores de la sociedad, desencadenando también otros problemas de malnutrición. La inseguridad alimentaria de los hogares, que repercute en un amplio espectro de la población, es la consecuencia de las relaciones de poder injustas que se fortalecen entre sí, y se expresa en bajos precios de las materias primas, con un margen de intercambio desfavorable para los países en vías de desarrollo. La persistencia de la pobreza y la degradación del medio ambiente basada en el aumento de las exportaciones y la inversión, hacen cuestionar de manera fundamental el modelo subyacente, por medio del cual se busca estabilizar y reestructurar la economía.

5. Si bien en la mayoría de los países latinoamericanos se aprecia cierto mejoramiento en el nivel nutricional de la niñez, acompañado de una progresiva reducción de la mortalidad infantil, existen en la región y en cada país áreas geográficas con tasas de desnutrición muy superiores al promedio regional y nacional.
6. Los problemas por carencias específicas (deficiencia de yodo, hierro, vitamina A y otros micronutrientes), representan problemas significativos en la región, principalmente en gran parte de las mujeres, niños y ancianos. Además están surgiendo otras formas de malnutrición por exceso que plantean serias dificultades de salud. Las enfermedades transmitidas por alimentos y los productos alimenticios de baja calidad constituyen un serio problema de salud pública, que a su vez interfiere negativamente en las relaciones del comercio nacional e internacional de los alimentos por su rechazo, principalmente en los mercados internacionales; trayendo como consecuencia grandes pérdidas económicas para los países.
Otro problema latente en nuestros países es la discriminación a la que está sometida la gran mayoría de las mujeres y en particular, la de escasos recursos económicos, por falta de políticas que les brinde sus derechos en educación, salud, nutrición, etc.
7. Junto con las limitaciones del contexto, coexisten una gama de recursos entre los que se encuentran:
 - * La existencia de nuevas corrientes y enfoques metodológicos para el trabajo, orientados a la construcción de una cultura humanista que rescata al hombre como esencia de la sociedad.
 - * La existencia de una cultura de la organización colectiva, que permite a la sociedad civil enfrentar sus problemas.
 - * Un mayor acceso a la información y educación de la población que permita la transferencia oportuna y adecuada de conocimientos en amplios sectores de la población.
 - * El desarrollo de la ciencia y tecnología que abre nuevas posibilidades de solución a los problemas nutricionales, con mayores niveles de eficiencia y eficacia.
 - * El desarrollo de una conciencia de género que permite a las mujeres avanzar en los diferentes espacios de la sociedad en la construcción de propuestas y ejecución de acciones para el cambio social.
8. Siendo ampliamente reconocida la necesidad de un enfoque multiseccional y de equipo multidisciplinario en las acciones de alimentación y nutrición, debe remarcarse, no obstante, el rol protagónico que el profesional

Nutricionista debe asumir fundamentalmente como agente dinamizador o eje integrador de las diferentes disciplinas involucradas en el accionar del sistema de alimentación-nutrición.

Nuestros retos y compromisos

Frente a lo anteriormente expuesto consideramos necesario explicitar en forma sucinta, los retos y compromisos que consideramos centrales, a efectos de reforzar nuestro rol de comunidad profesional comprometida con el progreso de nuestros pueblos:

1. Que el Nutricionista y Dietista asuma el rol protagónico que le corresponde en planificación, ejecución y evaluación de proyectos y programas como también en la vigilancia alimentaria y nutricional, dirigidos a la solución y prevención de los problemas alimentario-nutricionales, favoreciendo el desarrollo de una conciencia individual y colectiva que garantice una salud óptima.
2. Que en la solución y prevención del problema alimentario-nutricional de nuestros pueblos, sean considerados prioritarios a los Nutricionistas y Dietistas dentro de las políticas económicas y sociales, a nivel de la región y en cada uno de los países.
3. Que en la solución de los problemas alimentario-nutricionales de los países de la región se utilicen estrategias innovadoras y creativas, al mismo tiempo que se comprenda e integre el conocimiento autóctono en la planificación de los proyectos y programas, a nivel nacional y local, promoviendo la participación de la comunidad.
4. Que el Nutricionista y Dietista de Latinoamérica y el Caribe responda de manera entusiasta e innovadora a los desafíos y oportunidades que le brindan las nuevas tecnologías y el desarrollo científico y económico que le ofrece el siglo XXI, en beneficio de la humanidad y en condiciones de trabajo adecuadas y acorde a las responsabilidades de su profesión.
5. Que todas las Organizaciones de Nutricionistas y Dietistas de Latinoamérica y el Caribe promuevan el fortalecimiento de la participación profesional del Nutricionista-Dietista interdisciplinariamente, ante el Estado, Organismos Nacionales e Internacionales y la sociedad.
6. Que todas las Organizaciones de Nutricionistas y Dietistas de Latinoamérica y el Caribe, promuevan en sus países la excelencia profesional de sus asociados, a través de la optimización de oportunidades académicas durante el ejercicio profesional, mediante programas de actualización, cursos de especialización, estadías de perfeccionamiento y trabajos de investigación en el campo de la alimentación y nutrición.

7. Que las Instituciones Académicas realicen las adecuaciones curriculares necesarias de acuerdo a los cambios experimentados en el perfil demográfico epidemiológico y socioeconómico de cada país.
8. Motivar a las organizaciones de la sociedad civil, para actuar organizada y articuladamente en defensa de los derechos del consumidor.
9. Instar a los Gobiernos a cumplir con los compromisos suscritos en la Declaración y Plan de Acción Regional para Latinoamérica (1992) y la Declaración Mundial sobre Nutrición (1993).
10. Que todos los Nutricionistas y Dietistas deben constituirse en promotores del cambio, con capacidad de propuesta y respuesta frente a las demandas y necesidades de la sociedad, con capacidad para articular esfuerzos e integrar procesos, con compromiso para desarrollar acciones con solvencia ética y técnico-profesional.

Reproducido del original elaborado por la CONFELANYD en Lima-Perú el 28 de Octubre de 1995.

Nuevos Libros

**“Nutriología médica”. 1a. Edición.
Editorial Médica Panamericana
Fundación Mexicana para la salud**

Un nuevo libro latinoamericano, ahora de México, sobre nutrición, acaba de publicarse. Se trata de *Nutriología Médica*, escrito por un grupo de médicos y licenciados en nutrición, con gran experiencia en la clínica y estudios comunitarios.

La necesidad de un libro como éste era insoslayable. Los autores han llenado con creces un vacío en la literatura latinoamericana escrita en español. La carencia de libros con sabor latinoamericano era muy sentida por los profesionales y estudiantes de nutrición.

El libro contiene tres partes fundamentales. La primera se refiere a los problemas nutricionales en las diferentes etapas de la vida, desde la niñez hasta la vejez. La segunda sección se ocupa de la patología nutricional, tanto en los aspectos relativos al diagnóstico como al tratamiento. La tercera parte incluye aspectos básicos de la nutrición, tales como los nutrientes, calorimetría y evaluación del estado de nutrición.

Como se dice en la introducción del libro, «*Nutriología Médica*» es una obra diseñada pensando en cuatro aspectos fundamentales:

1. Representa el primer contacto del estudiante con el comienzo de la nutriología.
2. Es un libro de carácter introductorio, que por lo tanto presenta una panorámica amplia de los temas nutriológicos.
3. Por ser un libro de carácter clínico, ofrece una visión equilibrada entre las acciones de prevención, diagnóstico y tratamiento de los trastornos nutricionales, y
4. El material que constituye esta obra deberá ser revisado de preferencia después de que el estudiante haya cursado las materias del área básica.

Los autores son sobradamente conocidos, no sólo en México, sino en América Latina. Ellos son Esther-Casanueva, Martha Kaufer-Horwitz. Ana Berta Pérez-Lizaur y Pedro Arroyo.

El texto fue revisado cuidadosamente por José Angel Ballabriga, de Barcelona (España), Eleazar Lara Pantín (Venezuela) y Silvestre Frenk (México).

Todo ello es una garantía de la calidad de la obra que tendrá, sin duda, una gran difusión. Finalmente deseamos destacar la presentación, que constituye un lujo editorial, pocas veces visto. La riqueza del papel, los grabados y colores, dan a la obra categoría excepcional.

Felicitemos a los autores, amigos entrañables, por este esfuerzo que estoy seguro, los lectores sabrán apreciar.

José María Bengoa

«Estado Nutritivo en Colectivos Escolares Madrileños»

Ana María Requejo Marcos, Rosa María Ortega Anta y Trinidad Rivas Martínez. Dpto. de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid-España. 1994.

Este folleto de bien lograda diagramación presenta los resultados de la situación nutricional de 313 niños entre 2 y 13 años de edad, de 3 colectivos de Madrid (dos colegios y dos guarderías) y recoge datos dietéticos, antropométricos, hematológicos y bioquímicos. La publicación se ordena en 3 áreas principales: Importancia del Estudio; Diseño Experimental y Resultados Obtenidos. Esta última comprende Ingesta de Alimentos; Ingesta de Energía y Nutrientes; Estudio Antropométrico; Estudio Hematológico y Bioquímico. Siguen las Conclusiones en las cuales se plantean y comentan los problemas nutricionales siguientes: deficiencia de hierro, baja ingesta de calcio, padecimiento de algunas deficiencias vitamínicas y de otros minerales, hipercolesterolemia, sobrepeso y obesidad. 14 páginas, 62 referencias.

(La publicación es gratuita y puede obtenerse de: Area de Salud Pública del Excelentísimo Ayuntamiento de Madrid. C/ Mayor Nº 58-28013 Madrid, España).

José Félix Chávez Pérez

Información para los autores

A. CONTRIBUCIONES A LA REVISTA

La Revista publica Editoriales, Artículos Generales, Trabajos de Investigación y de Nutrición Aplicada, y Cartas al Editor. Para su aceptación, las diversas contribuciones deben tratar temas de nutrición humana o animal, ciencia y tecnología de alimentos, factores socioeconómicos, de orden antropológico o cultural, relacionados con la nutrición humana.

1. Los *Artículos Generales* son revisiones críticas sobre algún tema de interés en el campo de la nutrición y ciencias afines, o discusiones generales que contengan criterios propios o recomendaciones de aplicación práctica, debidamente respaldadas por argumentos válidos.
2. Los *Trabajos de Investigación* se refieren a los resultados de estudios de experimentación llevados a cabo hasta el punto que permite la deducción de conclusiones válidas.
3. Los *Trabajos de Nutrición Aplicada* conciernen a la implementación de medidas basadas en la investigación, cuya finalidad es mejorar el estado nutricional de las poblaciones.
4. Las *Cartas al Editor* son notas cortas, de un máximo de 3 páginas, sobre temas de interés general u observaciones o críticas sobre alguna contribución publicada en la Revista.

B. NORMAS PARA LA ELABORACION DE MANUSCRITOS

1. La elaboración de los manuscritos se regirá de acuerdo a las siguientes normas:
 - papel tamaño carta (21,5 x 28 cm)
 - a máquina o procesador de palabras (Microsoft Word o Word Perfect en diskettes de 3.5)
 - a doble espacio
 - hojas numeradas
 - máximo 18 hojas
 - por triplicado

Los manuscritos que no cumplan con estas condiciones serán devueltos al autor.

2. Los trabajos serán remitidos a los Editores de la revista después de haber sido cuidadosamente revisados por el autor.
3. Los trabajos pueden ser redactados en español, inglés, portugués o francés según la preferencia del autor.

C. ORGANIZACION DEL MANUSCRITO

Se recomienda organizar cada manuscrito como sigue:

1. Título

La primera página del manuscrito debe contener el título completo del trabajo en mayúsculas, nombre completo y apellido del autor, institución de origen con letras iniciales mayúsculas y el resto en minúscula. (En la página siguiente debe indicarse el cargo que cada autor desempeña, identificándolos debidamente).

2. Resumen en el idioma original del artículo

Este debe ser informativo, presentado en hoja separada del texto, y preparado en forma clara y concisa para el lector que no ha leído el texto del artículo. Debe especificar también el propósito, método, resultados importantes y principales conclusiones.

3. Introducción

Debe indicar claramente el objetivo o hipótesis de la investigación y sus relaciones con la nutrición y otros trabajos existentes, evitándose largas revisiones bibliográficas.

4. *Material y Métodos*

La descripción de los materiales debe hacerse en forma concisa. Cuando las técnicas o procedimientos utilizados hayan sido publicados, deberán mencionarse, e incluir sólo los detalles de técnica que representan modificaciones substanciales del procedimiento original. Cuando se utilicen términos locales o regionalismos, éstos deberán ser aclarados mediante su denominación científica o de su uso general.

5. *Resultados*

Estos se presentarán en lo posible en Tablas y/o Gráficas que serán respaldadas por cálculos estadísticos, evitando la repetición de datos y seleccionando la forma que en cada caso resulte adecuada para la mejor interpretación de los resultados. Si hubiera subdivisiones ellas se encabezarán con un subtítulo.

- a) Las gráficas e ilustraciones deberán ser presentadas en fotografías de papel brillante, no montadas, y llevar el nombre del autor y el número correspondiente en el dorso. Cuando sea necesario deberá señalarse la parte superior e inferior de la gráfica.
- b) En caso de dibujos o esquemas, éstos serán realizados en tinta negra en papel de buena calidad. La ubicación de cada gráfica deberá indicarse, a lápiz, al margen del texto marginal. Los símbolos deberán especificarse en la propia gráfica.
- c) Los ejes (coordenadas) de las ilustraciones deben tener una indicación clave del fenómeno que representan, así como de las unidades de medida.
- d) Cada gráfica o ilustración deberá identificarse con la leyenda respectiva y contar con los datos imprescindibles para su interpretación.
- e) Las tablas deben numerarse según su orden de presentación en el texto y se entregarán en hojas aparte.
- f) Cada tabla debe contener un breve título que indique claramente su contenido. Las aclaraciones a las tablas deben hacerse mediante notas al pie, y se identificarán con letras minúsculas consecutivas colocadas como post-fijo superior en la cifra o valor correspondiente. Los encabezamientos de las columnas deben ser cortos o abreviados, incluyéndose, en nota al pie, una aclaración en caso necesario. Las líneas horizontales deben reducirse al mínimo y nunca usar las verticales.
- g) En cada columna se indicará claramente la medida usada por ej. mg/g, etc. Para concentraciones no se debe usar la expresión % sino, por ej. g/100 ó mg/100 ml. Se deben indicar con claridad todas las pruebas estadísticas usadas. Las tablas deben tener toda la información necesaria para su interpretación.
- h) No debe presentarse simultáneamente el mismo material experimental en forma de tablas y gráfica.

6. *Discusión*

Debe ser breve y restringirse a los hechos significativos del trabajo. Es recomendable usar subtítulos en las diversas secciones del manuscrito, indicando las diferentes materias tratadas. En caso que, a juicio de los autores, la naturaleza del trabajo lo permita, puede hacerse una discusión de los resultados inmediatamente después de su expresión, bajo el título general de **Resultados y Discusión**. Lo expresado en los incisos a) y h) en la sección precedente, aplican igualmente a esta sección.

7. *Resumen en inglés*

Todo trabajo deberá acompañarse de un resumen en inglés, si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. El título del trabajo también debe redactarse en inglés. Si el trabajo original es en inglés, el resumen debe presentarse en español, así como el título del trabajo también en este idioma.

8. *Agradecimiento (si lo hubiere)*

9. *Citas bibliográficas y Referencias bibliográficas*

Las citas bibliográficas se indican con números arábigos en el texto, entre paréntesis y por orden de aparición, no por orden alfabético de autores.

Para la sección Referencias bibliográficas, al final del trabajo, se aplican las mismas normas y serán presentadas de acuerdo a los siguientes ejemplos:

- a) De revistas:
Liendo Coll, P & JM Bengoa. Necesidades calóricas de la población venezolana. Arch Venez Nutr 5:39-50, 1954.
- b) De libros:
Gómez P, F Silvio & R Gámora. Los Aminoácidos en alimentos. Caracas, Ed Futura, 1972, p.30.
- c) De libros sin autor individual:
Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC. 12th ed. Washington, DC, The Association, 1975, p. 30.
- d) De un artículo o capítulo de un autor(es) consignado en un libro publicado por casa editora:
Hoskins, WG & M Charles. Macaroni production. En: The Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed. SA Matz (Ed.). Westport, Conn, The Avi Publishing Co. 1959, p. 274-320.
- e) De citas de compendios:
Krebs, HA & K Henseleit. Urea formation in animal body. Z Physiol Chem, 210:33-66, 1932. (Original no consultado; compendiado en Chem Abst 26: 5624, 1923).

10. *Notas al pie de la página*

Las notas al pie de la página deben ser reducidas al mínimo. Cuando su inclusión sea necesaria deberá indicarse su orden de aparición en el texto mediante números arábigos, consecutivos colocados como post-fijo superior. (Estas notas se redactan, debidamente identificadas, en la 2a. hoja del manuscrito, después de la identificación de los autores).

11. *Abreviatura y siglas*

Se deben usar las abreviaturas aceptadas internacionalmente (American Chemical Society, Journal of Nutrition, British Journal of Nutrition). En caso de utilizarse siglas poco comunes, que se repitan frecuentemente en el manuscrito, deberán indicarse completas la primera vez que se citan, seguidas de la sigla entre paréntesis. De preferencia, deberán usarse las siglas internacionales en vez de la del idioma original del artículo, por ej. DNA, RNA, PER, etc. Todas las abreviaciones y siglas se usan sin punto, g, b, m, etc.

12. *Nomenclaturas*

Deberá usarse la nomenclatura de la Unión Internacional de Ciencias de la Nutrición (IUNS) para vitaminas y otros nutrientes. En las unidades de medición se empleará el Sistema Métrico Decimal. Para las unidades de energía se usarán calorías (Cal) o Joules (J) indiscriminadamente.

13. *Resultados numéricos*

Al consignar números se usará la coma (,) para indicar decimales, p. ej. 35,7; 389,9; y el punto (.) para indicar miles, millones, etc.

D. SEPARATAS

El costo de las separatas o sobretiros de los trabajos es de US \$3.00 por página de 50 separatas. El autor(es) deberá notificar a la Oficina Editorial el número de separatas deseado tan pronto se le informe que su trabajo ha sido aceptado.

E. CARGO POR PAGINA

La Revista es un órgano de divulgación científica sin fines de lucro y es mantenida fundamentalmente con donaciones. Sin embargo, a los efectos de contribuir con los gastos de publicación, la Asamblea General de SLAN ha creado un cargo de US \$ 10,00 por página de trabajo publicado. La Oficina Editorial puede considerar una reducción por concepto de cargo por página previa solicitud dirigida en ese sentido por el autor(es). Tan pronto como su factura sea cancelada, se les proporcionará 15 separatas libres de costo.

Information to authors

A. CONTRIBUTIONS TO THE «ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION» (ALAN)

ALAN publishes Editorials, General Articles, Research and Applied Nutrition Papers and Letters to the Editor. To be accepted, written contributions must discuss nutrition-related topics such as human or animal nutrition, food science and technology, or socioeconomic issues, of an anthropologic or cultural nature, as related to human nutrition.

1. *General Articles* are critical reviews about a topic of interest in the field of nutrition or related sciences, or general discussions containing the author's own criteria or practical applied recommendations supported by valid arguments.
2. *Research Papers* describe results obtained from experimental studies performed and from which valid conclusions may be inferred.
3. *Papers on Applied Nutrition* are concerned with implementation of research-based measures that seek to improve the nutritional status of populations.
4. *Letter to the Editor* are short notes, maximum 3 pages long, on topics of general interest or critical observations about an article published in ALAN.

B. STANDARDS FOR MANUSCRIPTS

1. Manuscripts should be submitted according to the following standard rules:

- letter-size paper (21.5 x 28 cm)
- type or printed
- double-spaced
- numbered pages
- maximum 18 pages
- in triplicate

Manuscripts that do not meet the above standards will be returned to their authors.

2. Papers must be addressed to the Editors of ALAN after a careful review by the author.
3. Papers may be written in Spanish, English, Portuguese or French, according to the author's language of preference.
4. In order to expedite editorial work, a 3.5 disk copy (Microsoft Word or Word Perfect) of the paper is welcome in addition to the three hard copies requested above.

C. HOW THE MANUSCRIPT SHOULD BE ORGANIZED

The following order is recommended:

1. Title

The first page of the manuscript must contain the paper's complete title in capital letters; the author's name and surname and the name of the sponsoring or work institution, where the first letter must be in capitals and the rest, small. (On the next page, authors will identify themselves, stating their title and/or position).

2. Summary in original language

The summary should be informative, prepared on a single page free from the main text. It should describe the purpose, method, important results and conclusions.

3. Introduction

It should state the purpose or research hypothesis clearly and how it relates to nutrition or to other pertinent papers. Long literature reviews should be avoided.

4. *Material and Methods*

Material descriptions should be concise. When techniques or procedures used have been published they should be mentioned, and a detailed description should only be given when there is a substantial variation from the original method or technique. Where local or regional terms are used, an explanation should follow giving the scientific name or a widely accepted term.

5. *Results*

Wherever possible results should be presented in a tabulated or graphical form, backed by pertinent statistical calculations. Data should be presented in a manner that will facilitate result interpretation and avoid repetition. Text subdivisions are to be headed by subtitles.

- a) Graphs and illustrations are to be presented plainly, on shiny photographic paper, with author's name and pertinent number on the back. Where needed, the upper and lower sides of the graph or photograph should be identified.
- b) Drawings or sketches must be done with black ink on quality paper. Graph location must be given in each case with a pencil note on the margin. Symbols must be shown as part of the graph.
- c) Axes (coordinates) on graphs and/or illustrations must include key indications of the phenomena they represent as well as of measuring units.
- d) Each graph or illustration must be identified by its respective legend and include the necessary interpretation data.
- e) All tables must be numbered according to the order they appear in the text and must be presented on separate pages.
- f) Each table must bear a brief title clearly describing its contents. Notes to the tables must be given as footnotes, identified by means of small consecutive letters added as a post-fix above the corresponding figure or value. Column headings should be short or abbreviated and explanations should be provided in a footnote where necessary. Horizontal lines should be used minimally and vertical lines not used at all. Measures used should be shown for each column, ie: mg/g, etc. Concentrations should not be expressed as % but as g/100 ml or mg/100 ml. Statistical tests used must be clearly pointed out. Tables must include all the necessary information for interpretation.
- g) Experimental material should not be presented in a tabulated and graphic manner simultaneously.

6. *Discussion*

The discussion should be brief and keep to the significant parts of the work. The use of subtitles as headings to the different matters raised in the paper is recommended. Subject to the author's judgement, and wherever it may be appropriate, results may be discussed immediately after their expression under a general heading «Results and Discussion». Instructions given in paragraphs a) and h) are also applicable to this section.

7. *Summary in English*

When papers are submitted in Spanish, Portuguese or French, a Summary in English and the paper's Title in English must also be submitted. If the original paper is written in English, then a Summary in Spanish and the paper's Title in Spanish must be submitted too.

8. *Acknowledgements (If any)*

9. *Bibliographic Quotes and References*

Bibliographic quotes are shown by Arabian numbers in the text, in parenthesis and order of appearance, not by authors' alphabetical order.

References, at the end of the paper, will be presented in the same manner as Quotes above and according to the following examples:

- a) From Journals or Magazines: Liendo Coll, P & JM Bengoa. Calorie requirements of the Venezuelan population. Arch Venez Nutr 5:39-50, 1954.
- b) From Books: Gómez P, F. Silvio & R Gámora. Aminoacids in Foods. Caracas, Ed Futura, 1972, p. 30.
- c) From Books with no single author: Association of Official Agricultural Chemists. Official Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC. 15th ed Washington, D.C., The Association, 1990, p.30.
- d) From an Article or a single Chapter by one or several Authors included in a Book by a Publishing House: Hoskins, WG & M Charles. Macaroni Production. En: The Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed. SA Matz (Ed.) Westport Conn, The Avi Publishing Co., 1959 p. 274-320.
- e) From Quotes in Abstracts: Krebs, HA & K Henseleit. Urea formation in animal body. Z Physiol Chem, 210:33-66, 1932 (Original not consulted; condensed in Chem Abst 26: 5624, 1932).

10. *Footnotes*

Footnotes should be kept to a minimum, but where needed footnotes are to be indicated by order of appearance in the text by means of Arabian numbers in a consecutive manner as a postfix above. (Duly identified footnotes will appear on the second page of the manuscript, after the authors' identification).

11. *Abbreviations and Acronyms*

Internationally accepted acronyms should be used (American Chemical Society, Journal of Nutrition, British Journal of Nutrition). If unusual acronyms are used frequently in a manuscript, the full name they stand for must be given the first time they are used in the text, followed

by the acronym in parenthesis. Preferably, international acronyms should be used instead of those used in the paper's original language, such as DNA, RNA, PER, etc. Abbreviations and acronyms are not to be followed by a point: g, b, m, etc.

12. *Nomenclature*

Nomenclature as set by the International Union of Nutrition Sciences (IUNS) for vitamins and other nutrients should be used. The metric system will be used for measuring units. Units of energy may be expressed as either calories (Cal) or Joules.

13. *Numerical Results*

Upon writing numbers, a comma (,) will be used to express decimal, ie: 35,7; 389,9. And the point (.) will be used to express thousands, millions, etc.

D. REPRINTS

The cost of reprints or extra prints is \$3.00 per page per 50 reprints. Authors must advise the Editors Office the number of reprints they wish to order as soon as their paper has been accepted.

E. CHARGE PER PAGE

ALAN is a non-profit scientific publication mainly supported by donations. The Board of Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), however, established a US\$ 10.00 charge per page published to help pay for publishing expenses. The Editor's Office may considerer a reduction on the charges per page following a request submitted thereto by the author(s). As soon as the invoice is paid, authors will receive 15 reprints free of charge.

Indice General del Volumen 45 - 1995

EDITORIALES	5, 83, 167, 257
--------------------------	-----------------

ARTICULOS GENERALES:

Isótopos estables en estudios de investigación en nutrición. Soledad de Santiago y Lourdes Barbosa.....	6
Agricultural and food policies, Some concerns regarding their nutritional relevance. Guillermo Arroyave	12
Bases bioquímicas do suporte nutricional enteral. Freitas O., Dos Santos J.E., Greene L.J., Dutra de Oliveira J.E.....	84
Avaliacao do programa de merenda escolar do Municipio de Campinas, Brasil. Elisabete Salay e José Ferreira de Carvalho.....	167
Defining cooking salt intakes for patient counselling and policy making. Claudia P. Sánchez-Castillo and W. Philip T. James	259
Pasado y presente en el diseño de fórmulas infantiles. Patricia Ana Ronayne de Ferrer	265

TRABAJOS DE INVESTIGACION:

Nutrición Humana

Peso para la talla de escolares chilenos, según la edad y el grado de desarrollo puberal Burrows Argote Raquel, Leiva Balic Laura, Muzzo Benavides Santiago	19
Evaluación biológica de un sustituto lácteo para el escolar, a base de harina de trigo cruda refinada, sometida a hidrólisis enzimática. Gladys Barrera, Vivien Gattas y Ricardo Uauy	90
Factores de riesgo de talla baja en escolares chilenos de zonas rurales de alta vulnerabilidad social. Hugo Amigo C. y Patricia Bustos M.	97
Contribuição do programa de merenda escolar - Ciclo Básico - para as recomendacoes nutricionais de escolares. Marina Vieira da Silva	103
Balance de minerales durante la recuperación nutricional en lactantes con desnutrición energético-proteica. María Verónica Marín Briano, Carlos Castillo Durán y Ricardo Uauy Dagach	172
Mineralización ósea e ingesta de calcio en escolares chilenos. Laura Leiva, Raquel Burrows, Ricardo Lillo, Hugo Pumarino y Santiago Muzzo	178
Mineralización ósea en adolescentes que padecieron desnutrición postnatal temprana. Santiago Muzzo, Laura Leiva, Ricardo Lillo, Hugo pumarino, Renata Ernest, y Raquel Burrows	183
Evaluación química y nutricional de un alimento para adultos a base de soja y cereales. María Catalina Olgún, Susana Agnese Calderari, María Delia Posadas, Gilda Celina Revelant, Maria del Carmen Gayol, María Isabel Zingale, Miryam Elsa Vignale Verónica Beatriz Labourdette, Mariela Balseiro, y Andrés Agustín Torriggino	187

Desarrollo de un programa para la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad por ordenador.

Rodríguez, María del Carmen Coupeau, Ignacio, Larralde Jesús y Martínez J., Alfredo 274

Indicadores braquiales de grasa y músculo de escolares de una comunidad rural según el grupo social. (General Lavalle. Buenos Aires, Argentina)

Andrés Guillermo Bolzán y Luis Manuel Guimarey..... 281

Nutrición Animal

Evaluación del ensilado biológico de pescado en pollos de engorde.

Rafael Antonio Bello y Yurubi Fernández 134

Evaluación de los niveles de efectividad de mezclas vegetales en la recuperación de animales con desnutrición proteico-energética precoz y tardía.

Patricia Liliana Jiménez de Erramouspe y Margarita Armada de Romano 227

Bioquímica Nutricional

Efecto de precargas proteicas y de hidratos de carbono sobre el consumo de alimentos y energía en preescolares con diferente estado nutricional.

Héctor Araya L., Marcela Alviña W., Gloria Vera A. Nelly Pak D., Juan Carlos Sola, Carlos Díaz 25

Comparación de la situación nutricional en escolares de bajo nivel socioeconómico de Santiago (Chile) y San Pablo (Brasil).

Hugo Amigo, Patricia Bustos, Claudio Leone, y Paulo Gallo de Santiago (Chile)..... 31

Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas in vivo e in vitro y su efecto sobre el cómputo químico.

Diamela Carias, Anna M . Cioccia y Patricio Hevia.. 111

Alteracoes histologicas de glandulas submandibulares e testiculos induzidas por dietas a base de soja e dieta zinco deficiente em ratos.

Vanderlei L.C.M., Arruda Veiga M.C.F., Reis N.S. y Tambeli C.H. 193

Zinc, copper and iron and their interrelations in the growth of sickle cell patients.

Josefina A. Pellegrini Braga, José Kerbauy, Mauro Fisberg 198

Effects dietary fat and nitrite on plasma and corporal density.

Rebeca C. de Angelis, Ilza C.M. Terra, Julieta H. Scialfa, Itamar Klemps F. 204

Changes of serum lipids in vitamin K3 (menadione) treated rats.

Alarcón, O.M., Reinoso F.A., Silva L., T.M., Padrón F., A 286.

Influencia de la ingesta de aceites vegetales en la absorción intestinal de glucosa in vitro en hamster dorado.

Iris González, Marcela Escobar y Mauricio Villarroel 290

Polyunsaturated fatty acid deficiencies:effects on hepatic plasma membrane fatty acid composition and enzyme activity.

Angulo, G.O..... 295

Interação de zinco e vitamina A em ratos na lactacao. Modelo de deficiencia experimental.

Lucia Kiyoko Ozaki Yuyama y Silvia María Franciscato Cozzolino. 305

Ciencias de Alimentos

Effects of dehulling and storage conditions on cooking requirements and chemical composition of soybeans.

L.C. Cabral, S.O. Serna-Saldivar y A.M. Tinsley. 36

Effects of dehulling, cooking and storage conditions on protein quality and digestibility of soybeans.

L.C. Cabral, S.O. Serna-Saldivar, A.M. Tinsley y C. W. Weber 41

The effect of soaking time on water absorption and solid losses of whole and dehulled soybeans.

L.C. Cabral, S.O. Serna-Saldivar y A.M. Tinsley..... 46

Efecto de la localidad de siembra sobre aceptación sensorial y otras características nutricionales y de calidad del grano en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	
Javier Z. Castellanos, Horacio Guzmán-Maldonado, Elvira González de Mejía y Jorge A. Acosta Gallegos	50
Conservación y estabilidad de la tortilla de maíz a temperatura ambiente.	
Inocencio Higuera-Ciapara y José Manuel Nieblas	122
Caracterización bioquímica de las proteínas de jaiba mora (<i>Homalaspis plana</i>).	
Lilian Abugoch J., Abel Guarda M. y Mario Chiong L.	216
Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedlings of three soybean cultivars.	
Bordingnon J.R., Ida E.L., Oliveira M.C.N. y Mandarinó J.M.G.	222
Extraction, purification and some partial characterization of α-Amylase inhibitors from wheat Iapar 28-Igapo.	
Neide Kiyoko Kondo and Elza Iouko Ida	310
Control de la actividad proteolítica en ensilado de pescado.	
Tomé, Elizabetta, Levy Benšimol, Abraham y Bello, Rafael Antonio.....	317
 <i>Bacteriología de Alimentos</i>	
Calidad microbiológica de frutas que se venden en puestos callejeros de San José de Costa Rica, Costa Rica.	
Rafael Monge, Ma. Laura Arias, Florencia Antillán y Dagmar Utzinger.....	117
Comparación de metodologías para la detección y enumeración de bacterias ácido lácticas en el yogurt.	
Ana Graciela Briceño y Raúl Martínez.....	207
Residuos de antibióticos en leche pasteurizada distribuida en servicios de nutrición hospitalarios de Costa Rica.	
Rafael Monge, Magaly Caballero y Rita Coghi.....	213
 <i>Vigilancia Nutricional</i>	
Vigilancia del consumo de alimentos	
Carola García Gh. y Bety Ayila L.....	56
 <i>Tecnología de Alimentos</i>	
Desarrollo de productos para el adulto mayor: Budin enriquecido con vitaminas.	
María Soledad Vera, Emma Wittig de Penna, Andrea Bunger, D. Soto, L. Cariaga, R. Fuenzalida, E. Cornejo, L. López	63
Elaboración de un guiso liofilizado para montañistas.	
Emma Wittig de Penna, Viviana Kutscher, Andrea Bunger, Luis López, Raúl Santana.....	67
Processamento de cará de rama (<i>Dioscorea bulbifera</i>, L.) frito.	
Sila Mary Rodrigues Ferreira	128
Uso del germen desgrasado de maíz en harinas compuestas para panificación.	
Marisela Granito y Marisa Guerra.....	322
Desarrollo de un picadillo de humedad intermedia para ancianos con base en soya texturizada.	
Josefina C. Morales de León, Patricia Cecin Salomón y Ma. de la Luz Crail Chávez.....	329
 LatinFoods. Composición de Alimentos	
Evaluation of bush and vine black beans for physical, chemical and nutritional characteristics.	
Ricardo Bressani, Vivian Benavides, Eduardo Calderón, Miguel A. Ortíz and Carlos Chon	140
Composición química, fibra dietética y contenido de minerales en alimentos de consumo frecuente en el noroeste de México.	
Maria Isabel Grijalva Haro, Graciela Caire, Armida Sánchez y Mauro E. Valencia	145

Comparación entre los valores analizados y calculados del contenido de energía, grasa, proteína, fibra dietética, hierro y zinc en dietas del noroeste de México de diferentes niveles socioeconómicos.	
Rosa Olivia Méndez Estrada y Carolyn Jane Wyatt.....	151
Caracterizacáo química da polpa e do óleo do marolo (<i>Annona coriaceae</i>).	
Tânia da S. Agostini, Heloisa M. Cecchi y Daniel Barrera-Arellano	237
Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas.	
Rosana Cantoral, Alfredo Fernández-Quintela, J. Alfredo Martínez y M. Teresa Macarulla.....	242
Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (<i>Eriobotrya japonica Lindl</i>)	
Helena T. Godoy and Delia B. Rodríguez-Amaya	336
NOTAS	76, 159,340
NUEVOS LIBROS	249, 343
INFORMACION PARA LOS AUTORES	77, 160, 250,344
INDICE DE AUTORES	354
INDICE DE MATERIA	360

Indice por Autores del Volumen 45 - 1995

A

Acosta - Gallegos, Jorge A. véase Castellanos, Javier Z.	50
Abugoch J., Lilian.- Caracterización bioquímica de las proteínas de Jaiba Mora (<i>Homalaspis plana</i>)	216
Agnese Calderari, Susana véase Olguín, María Catalina	187
Alarcón, O.M. - Changes of serum lipids in vitamin K3 (Menadione) treated rats.....	286
Alviña W., Marcela véase Araya L., Héctor.....	25
Agostini da S., Tania.- Caracterizacáo química da polpa e do óleo do marolo (<i>Annona coriaceae</i>)	237
Amigo C, Hugo.- Comparación de la situación nutricional en escolares de bajo nivel socio-económico de Santiago (Chile) y San Pablo (Brasil).....	31
Amigo C, Hugo.- Factores de riesgo de talla baja en escolares chilenos de zonas rurales de alta vulnerabilidad social.....	97
Angelis, Rebeca C. de.- Effects of dietary fat and nitrite on plasma and corporal density	204
Angulo, G.O.- Polyunsaturated fatty acid deficiencias: effects on hepatic plasma membrane fatty acid composition and enzyme activity.....	295
Antillón, Florencia véase Monge, Rafael.....	117
Araya L., Héctor.- Efecto de precargas proteícas y de hidratos de carbono sobre el consumo de alimentos y energía en preescolares con diferente estado nutricional	25
Arias, María Laura véase Monge, Rafael	117
Armada de Romano, Margarita véase Jiménez de Erramouspe, Patricia Liliana	227
Arroyave, Guillermo.- Agricultural and food policies. Some concerns regarding their nutritional relevance	12
Arruda Veiga, M.C.F. véase Vanderlei, L.C.M	193
Avila L., Betty véase García Gh., Carola	6

B

Balseiro, Mariela véase Olguín, María Catalina.....	187
Barbosa, Lourdes véase Santiago, Soledad de	6
Barrera-Arellano, Daniel véase Agostini da S., Tania	237
Barrera, Gladys.- Evaluación biológica de un sustituto lácteo para el escolar, a base de harina de trigo cruda refinada, sometida a hidrólisis enzimática	90
Bello, Rafael Antonio.- Evaluación del ensilado biológico de pescado en pollos de engorde	134
Bello, Rafael Antonio véase Tomé, Elisabetta.	317
Benavides, Vivian véase Bressani, Ricardo.....	140
Bolzán, Andrés Guillermo.- Indicadores de grasa y músculo de escolares de una comunidad rural según el grupo social. (General Lavalle, Buenos Aires, Argentina)	281
Bordignon, J.R.- Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedlings of three soybean cultivars.....	222
Bressani, Ricardo.- Evaluation of bush and vine black beans for physical, chemical and nutritional characterists.....	140
Briceño, Ana Graciela.- Comparación de metodologías para la detección y enumeración de bacterias ácido lácticas en el yogourt	207

Bunger, Andrea véase vera, María Soledad	63
Bunger, Andrea véase Wittig de Penna, Emma	67
Burrows Argote, Raquel.- Peso para la talla de escolares chilenos, según la edad y el grado de desarrollo puberal.....	19
Burrows Argote, Raquel véase Leiva, Laura.....	178
Burrows Argote, Raquel véase Muzzo, Santiago	183
Bustos M., Patricia véase Amigo C, Hugo	31
Bustos M., Patricia véase Amigo C, Hugo	97

C

Caballero, Magaly véase Monge, Rafael	213
Cabral, L.C.- Effects of dehulling, cooking and storage conditions on protein quality and digestibility of soybeans	41
Cabral, L.C.- Effects of dehulling and storage conditions on cooking requirements and chemical composition of soybeans	36
Cabral, L.C.- The effect of soaking time on water absorption and solid losses of whole and dehulled soybeans	46
Caire, Graciela véase Grijalva Haro, María Isabel	145
Calderón, Eduardo véase Bressani, Ricardo	140
Cariaga, L. véase Vera, María Soledad	63
Carias, Diamela.- Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas en vivo e in vitro y su efecto sobre el cómputo químico.....	111
Castellanos, Javier Z. - Efecto de la localidad de siembra sobre la aceptación sensorial y otras características nutricionales y de calidad del grano en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	50
Cantoral, Rosana.- Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas.....	242
Castillo Duran, Carlos véase Marín Brianco, María Verónica.....	172
Cecchi, Heloisa M. véase Agostini da S. Tania.....	237
Cecin Salomón, Patricia véase Morales de León, Josefina.....	329
Chiong L. Mario véase Abugoch J. Lilian.....	216
Chon, Carlos véase Bressani, Ricardo.....	140
Cioccia, Anna M. véase Carias, Diamela.....	111
Coghi, Rita véase Monge, Rafael	213
Cornejo, E. véase Vera, María Soledad	63
Coupeau, Ignacio véase Rodríguez Ma. Carmen	274
Crail Chávez, María de la Luz véase Morales de León Josefina C.	329

D

Díaz, Carlos véase Araya L., Héctor	25
Dos Santos, J.E. véase Freitas O.	84
Dutra de Oliveira, J.E. véase Freitas O.	84

E

Ernst, Renata véase Muzzo, Santiago	183
Escobar, Marcela véase Gonzalez Iris	290

F

Falque Madrid, Luis véase Gotera de Prado, Zaida	83
Fernández -Quintela, Alfredo véase Cantoral, Rosana	242

Fernández, Yurubí véase Bello, Rafael Antonio	134
Ferreira de Carvalho, José véase Salay, Elisabete	167
Fisberg, Mauro véase Pellegrini Braga, Josefina A.	198
Franciscato Cozzolino, Silvia María véase Ozaki Yuyama, Lucía Kiyoko.....	305
Freitas O. - Bases bioquímicas do suporte nutricional enteral	84
Fuenzalida, R. véase Vera, María Soledad	63

G

Gallo, Paulo véase Amigo, Hugo C	31
García Gh., Carola.- Vigilancia del consumo de alimentos.	56
Gattas, Vivien véase Barrera, Gladys	90
Gayol, María de Carmen véase Olguín, María Catalina	187
Godoy, Helena T.- Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (<i>Eriobotrya japonica lindl</i>)	336
Gonzalez, Iris.- Influencia de la ingesta de aceites vegetales en la absorción intestinal de glucosa in vitro en hamster dorado.....	290
Gonzalez de Mejía, Elvira véase Castellanos, Javier Z.	50
Gotera de Prado, Zaida.- Editorial	83
Granito, Marisela.- Uso del germen desgrasado de maíz en harinas compuestas para panificación	322
Guerra, Marisa véase Granito, Marisela	322
Greene, L.J. véase Freitas O.	84
Grijalva Haro, María Isabel.- Composición química, fibra dietética y contenido de minerales en alimentos de consumo frecuente en el noroeste de México.....	145
Guarda M., Abel véase Abugoch M., Lilian	216
Guimarey, Luis Manuel véase Bolzán, Andrés Guillermo	281
Guzmán-Maldonado, Horacio véase Castellanos, Javier Z.	50

H

Hernández de Valera, Yolanda véase Gotera de Prado, Zaida	83
Hevia, Patricio véase Carias Diamela	111
Higuera-Ciapara, Inocencio.-Conservación y estabilidad de la tortilla de maíz a temperatura ambiente	122

I

Ida E.L. véase Bordingnon J.R.	222
Iouko Ida, Elsa véase Kiyoko Kondo, Neide	310

J

James, T. véase Sánchez-Castillo, Claudia P.....	259
Jiménez de Erramouspe, Patricia Liliana.- Evaluación de los niveles de efectividad de mezclas vegetales en la recuperación de animales con desnutrición proteico-energética precoz y tardía.....	227

K

Kerbaux, José véase Pellegrini Braga, Josefina	198
Kiyoko Kondo, Neide.- Extraction, purification and some partial characterization of α -amylase inhibitors from wheat iapar 28-igapo	310

Klemps F., Itamar véase Angelis; Rebeca de	204
Kutscher, Viviana véase Wittig de Penna, Emma	67

L

Labourdette, Verónica Beatriz. véase Olguín, María Catalina	187
Landaeta de Jiménez, Maritza véase Gotera de Prado, Zaida	83
Larralde, Jesús véase Rodríguez, Ma. Carmen	274
Leone, Claudio véase Amigo C, Hugo	31
Leiva Balic, Laura.- Mineralización ósea e ingesta de calcio en escolares chilenos.....	178
Leiva Balic, Laura véase Burrows Argote, Raquel	19
Leiva Balic, Laura véase Muzzo, Santiago	183
Levy Benshimol, Abraham véase Tomé, Elizabetta	317
Lillo, Ricardo véase Leiva Balic, Laura	178
Lillo, Ricardo véase Muzzo, Santiago	183
López, Luis véase Vera, María Soledad	63
López, Luis véase Wittig de Penna, Emma	67

M

Macarulla, M. Teresa véase Cantoral, Rosana	242
Mandarino, J.M.G. véase Bordingnon J.R.	222
Marín Briano, María Verónica.-Balance de mimerales durante la recuperación nutricional en lactantes con desnutrición energético-proteica	172
Martínez, J. Alfredo véase Cantoral, Rosana	242
Martínez J. Alfredo véase Rodríguez, Ma. Carmen.....	274
Martínez, Raúl véase Briceño, Ana Graciela	207
Méndez Estrada, Rosa Olivia.- Comparación entre los valores analizados y calculados del contenido de energía, grasa, proteína, fibra dietética, hierro y zinc en dietas del noroeste de México de diferentes niveles socioeconómicos	151
Monge, Rafael.-Calidad microbiológica de frutas que se venden en Puestos Callejeros de San José, Costa Rica	117
Monge, Rafael.- Residuos de antibióticos en leche pasteurizada distribuída en servicios de nutrición hospitalarios de Costa Rica	213
Morales de León, Josefina C.- Desarrollo de un picadillo de humedad intermedia para ancianos con base en soya texturizada	329
Muzzo Benavides, Santiago.- Mineralización ósea en adolescentes que padecieron desnutrición postnatal temprana	183
Muzzo Benavides, Santiago véase Burrows Argote, Raquel	19
Muzzo Benavides, Santiago véase Leiva Balic, Laura	178

N

Nieblas, José Manuel véase Higuera-Ciapara, Inocencio	122
---	-----

O

Olguín, María Catalina.- Evaluación química y nutricional de un alimento para adultos a base de soja y cereales	187
Oliveira, M.C.N. véase Bordingnon, J.R.	222
Ortíz, Miguel A. véase Bressani, Ricardo	140
Ozaki Yuyama, Lucia Kiyoto.- Interação de zinco e vitamina A en ratos na lactacao. Modelo de deficiência experimental	305

P

Padrón F., A. véase Alarcón, O. M.	286
Pak D., Nelly véase Araya L., Héctor	25
Pellegrini Braga, Josefina A. - Zinc, copper and iron and their interrelations in the growth of sickle cell patients	198
Peña Perdomo, Evelyn véase Gotera de Prado, Zaida	83
Philip, W. véase Sánchez-Castillo, Claudia P.	
Posadas, María Delia véase Olguín, María Catalina	187
Pumarino, Hugo véase Leiva Balic, Laura	178
Pumarino, Hugo véase Muzzo Benavides, Santiago	183

R

Reinosa F., A. véase Alarcón, O.M.	286
Reiss, N. S. Vanderlei, L.C.M. véase Vanderlei L.C. M.....	193
Revelant, Gilda Celina véase Olguín, María Catalina	187
Rodrigues-Amaya, Delia véase Godoy, Helena T.	336
Rodríguez Ferreira, Sila Mary.- Processamento de cará de rama (<i>Dioscorea bulbifera L.</i>) frito.....	128
Ronayne de Ferrer, Patricia Ana.- Pasado y presente en el diseño de fórmulas infantiles	265
Rodríguez, Ma . Carmen.- Desarrollo de un programa para la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad por ordenador.....	274

S

Salay, Elisabete.- Avaliacao do programa de merenda escolar do Municipio de Campinas, Brasil	167
Sánchez, Armida véase Grijalva Haro, María Isabel	145
Sánchez-Castillo, Claudia P.- Definig cooking salt intakes for patient counselling and policy making.....	259
Santana, Raúl véase Wittig de Penna Emma.....	67
Santiago, Soledad de -Isótopos estables en estudios de investigación en nutrición.....	6
Scialfa, Julieta H. véase Angelis, Rebeca de	204
Serna-Saldivar, S.O. véase Cabral L.C.	36
Serna-Saldivar, S.O. véase Cabral L.C.	41
Serna-Saldivar, S.O. véase Cabral, L.C.	46
Silva L., T.M. véase Alarcón, O.M.	286
Sola, Juan Carlos véase Araya L., Héctor.....	25
Soto, D. véase Vera, María Soledad	63

T

Tambeli, CH. véase Vanderlei, L.C.M.	193
Terra, Ilza C.M. véase Angelis, Rebeca C de	204
Tinsley, A.M. véase Cabral, L.C.	36
Tinsley, A.M. véase Cabral, L.C.	41
Tinsley, A.M. véase Cabral, L.C.	46
Tomé, Elisabetta.- Control de la actividad proteolítica en ensilado de pescado	317
Torriginno, Andrés Agustín véase Olguín, María Catalina	187

U

Uauy Dagach, Ricardo véase Barrera, Gladys	90
Uauy Dagach, Ricardo véase Marín Brianco, María Verónica	172
Utzinger, Dagmar véase Monge, Rafael	117

V

Valencia, Mauro E. véase Grijalva Haro, María Isabel	145
Vanderlei, L.C.M.- Alteracoes histologicas de glandulas submandibulares e testiculos induzidos por dietas a base de soja e dieta zinco deficiente em ratos.....	193
Vera A., Gloria véase Araya L., Héctor	25
Vera, María Soledad-. Desarrollo de productos para el adulto mayor: Budín enriquecido con vitaminas	63
Vieira da Silva, Marina.- Contribucao do programa de merenda escolar- ciclo básico para as recomendacoes nutricionais de escolares	103
Vignale, Miryam Elsa véase Olgúin, María Catalina	187
Villarroel, Mauricio vease González, Iris	290

W

Weber, C.W. véase Cabral, L. C.	41
Wittig de Penna, Emma.- Elaboración de un guiso liofilizado para montañistas.....	67
Wittig de Penna, Emma véase Vera, María Soledad	63
Wyatt, Carolyn Jane véase Méndez Estrada, Rosa Olivia	151

Z

Zingale, María Isabel véase Olgúin, María Catalina	187
--	-----

Indice por Materias del Volumen 45 - 1995

A

α -amylase, extraction, purification and some partial characterization of, inhibitors from wheat	
Iapar 28-igapo	310
Absorción intestinal, influencia de la ingesta de aceites vegetales en la, de glucosa in vitro en hamster dorado..	290
Acidos lácticas, comparación de metodologías para la detección y enumeración de bacterias, en el yogourt.....	207
Alimentos, vigilancia del consumo de	56

B

Beans, evaluation of bush and vine black for, chemical and nutritional characteristics	140
Budin enriquecido, desarrollo de productos para el adulto mayor: con vitaminas	63

C

Calcio, mineralización ósea e ingesta de, en escolares chilenos	178
Cara-de rama, processamento de, (<i>Dioscorea bulbifera</i> , L.) Frito	128

D

Desnutrición postnatal, mineralización ósea en adolescentes que padecieron, temprana	183
--	-----

E

Estado nutricional del lactante, desarrollo de un programa para la valoración del, y del niño de corta edad por ordenador	274
---	-----

F

Fat, effects dietary, and nitrite on plasma and corporal density	204
Fatty acid, polyunsaturated, deficiencies: effects on hepatic plasma membrane fatty acid composition and enzyme activity	295
Fibra dietética, composición química, y contenido de minerales de alimentos de consumo frecuente en el noroeste de México	145
Food, agricultural and, policies, some concerns regarding their nutritional relevance	12
Fórmulas infantiles, pasado y presente en el diseño de	265
Frijol común, efecto de la localidad de/siembra sobre aceptación sensorial y otras características nutricionales y de calidad del grano en, (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	50
Frutas, calidad microbiológica de, que se venden en puestos callejeros de San José de Costa Rica, Costa Rica	117

G

Gérmén desgranado de maíz, uso del, en harinas compuestas para panificación	322
Grasa, comparación entre los valores analizados y calculados del contenido de energía, proteína, fibra dietética, hierro y zinc en dietas del noroeste de México en diferentes niveles socioeconómicos	151
Grasa, indicadores braquiales de, y músculos de escolares de una comunidad rural según el grupo social (General Lavalle. Buenos Aires. Argentina)	281
Guiso liofilizado, elaboración de un, para montañistas	67

H

Hidratos de carbono, efectos de precargas proteicas y de, sobre el consumo de alimentos y energía en preescolares con diferente estado nutricional	25
--	----

I

Isotopos estables en estudios de investigación en nutrición	6
---	---

J

Jaiba mora, caracterización bioquímica de las proteínas de, (<i>Homalaspis plana</i>)	216
---	-----

L

Lácteo, evaluación biológica de un sustituto, para el escolar, a base de harina de trigo cruda refinada, sometida a hidrólisis enzimática	90
Leche pasteurizada, residuos de antibióticos en, distribuida en servicios de nutrición hospitalarios de Costa Rica	213
Leguminosas, estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteínas de	242

M

Marolo, caracterización química da polpa e do óleo de, (<i>Annona coriaceae</i>)	237
Merenda escolar, avaliação do programa de, do município de Campinas, Brasil	167
Merenda escolar, contribuição do programa de, - ciclo básico- para as recomendações nutricionais de escolares	103

Minerales, balance de, durante la recuperación nutricional en lactantes con desnutrición energético-proteíca	172
--	-----

P

Pescado, control de la actividad proteolítica ensilado de	317
Pescado, evaluación del ensilado biológico de, en pollos de engorde	134
Peso para la talla de escolares chilenos, según la edad y el grado de desarrollo puberal	19
Proteínas animales, grado de concordancia entre la digestibilidad de, y vegetales medidas in vivo e in vitro y su efecto sobre el cómputo químico	111

S

Salt, defining cooking, intakes for patient counselling and policy making	259
Sickle cell, zinc, copper and iron and their interrelations in the grow	198

Situación nutricional, comparación de la, en escolares de bajo nivel socioeconómico de Santiago (Chile) y San Pablo (Brasil)	31
Soja, alterações histológicas de glândulas submandibulares e testículos induzidas por dieta a base de, e dieta zinco deficiente em ratos	193
Soja, evaluación química y nutricional de un alimento para adultos a base de, y cereales.....	187
Soya, desarrollo de un picadillo de humedad intermedia para ancianos con base en, texturizada	329
Soybeans, effects of dehulling, cooking and storage conditions on protein quality and digestibility of	41
Soybeans, effects of dehulling and storage condition on cooking requeriment and chemical composition of.....	36
Soybean, effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxigenase-1 in seedings of three, cultivars	222
Soybeans, the effect of soaking time on water absorption and solid losses of whole and dehulled	46
Suporte nutricional, bases bioquímica do, enteral	84

T

Talla, factores de riesgo de, baja en escolares chilenos de zonas rurales de alta vulnerabilidad social.....	97
Tortilla de maíz, conservación y estabilidad de la, a temperatura ambiente	127

V

Vegetales, evaluación de los niveles de efectividad de mezclas, en la recuperación de animales con desnutrición proteico-energética precoz y tardía	227
Vitamin A, carotenoid composition and, value of Brazilian loquat (<i>Eriobotrya japonica Lindl</i>).....	336
Vitamin K3, changes of serum lipid in, (Menadione) treated rats	286

Z

Zinco, interação de, e vitamina A em ratos na lactacao. Modelo de deficiencia experimental.....	305
---	-----

Sociedad Latino Americana de Nutrición

S.L.A.N.

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN) fue creada hace más de 25 años con el fin de integrar los esfuerzos de profesionales calificados para promover y mejorar el conocimiento de los problemas nutricionales de los países de la región y de las alternativas de prevención y tratamiento que ofrece la nutrición como ciencia.

Cualquier persona que se encuentre profesionalmente activa o que haya contribuido de manera significativa al avance de la nutrición o disciplinas afines, puede asociarse a SLAN, para lo cual debe enviar una carta de solicitud avalada por dos Socios Activos y su curriculum actualizado. Debe igualmente anexar la documentación que pruebe la publicación de por lo menos, dos trabajos en revistas de nivel internacional en los últimos cinco años.

La solicitud puede dirigirse a la Presidencia de la Sociedad, actualmente en Venezuela, a los vocales representantes de Area o a los Capítulos de SLAN en los respectivos países.

El Consejo Directivo está integrado por: Eleazar Lara Pantin (Presidente), Hernán Delgado (Presidente Electo), Yolanda Hernández de Valera (Secretaria), Maritza Landaeta de Jiménez (Tesorera), Mauro Valencia (Vocal por México y Centro América), Rebeca de Angelis (Vocal por Brasil y Paraguay), Santiago Muzzo (Vocal por Argentina, Chile y Uruguay) y Manuel Grillo (Vocal por las Islas del Caribe).

Los Socios deben pagar una cuota anual de US \$30, que incluye la subscripción de la revista.

El órgano oficial de SLAN es la conocida revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN), que comparte actualmente la sede de la Sociedad en Caracas, Venezuela. Los manuscritos para publicación deben ser enviados al Editor General, Dr. Virgilio Bosch, o al Editor Asociado, Dr. José Félix Chávez P.

La correspondencia para SLAN o ALAN debe dirigirse al apartado 62.778, Chacao, Caracas 1060, Venezuela o a sus números de fax: 58 41 571475 y 58 2 284 8543.

¿CAMBIO DE DOMICILIO?

¿CHANGING YOUR ADDRESS?

Por favor, escriba su nueva dirección abajo y envíela al Departamento de Suscripciones de ALAN, adjuntando la etiqueta de un sobre de envío. Le rogamos avisarnos con 60 días de anticipación/Please print your new address below and return to the Journal Subscription Dept. with our label. Please advise 60 days in advance.

Nombre/Name:

Calle/Street:

Ciudad/City:

Estado, País/State, Country:

Código Postal/Postal Code:

Por favor enviar ALAN a mi nueva dirección a partir de: / Date new address effective:

Charles O. Stephens

Sociedad Latino Americana de Nutrición

S.L.A.N.

SOLICITUD DE INSCRIPCION

Nombre: _____

Título Profesional: _____

Estudios de Postgrado: _____

Cargo: _____

Lugar de trabajo: _____

Dirección del trabajo: _____

Código Postal: _____ Ciudad: _____

Teléfono: _____ Fax: _____ Télex: _____

Dirección Postal: _____

Código Postal: _____ Ciudad: _____ País: _____

Teléfono: _____ Fax: _____ Télex: _____

Fecha de la solicitud: ____ / ____ / ____

Anote las referencias bibliográficas de dos de sus publicaciones más recientes:

1. _____

2. _____

Socios de SLAN que le postulan

Nombre:

Firma:

Adjunte su Curriculum Vitae actualizado.

La cuota anual de SLAN es de \$30 con la revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición y de \$10 sin la revista.
Los cheques deben ser emitidos en US \$ a nombre de: SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICION.

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

Charles O. Stephens

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 está constituida por los siguientes miembros:

Presidente	Dr. Hernán L. Delgado
Presidente Electo	Dr. Alejandro O'Donnell
Secretario	Dra. Rafael Flores
Tesorero	Lic. María Teresa Menchú
Vocal	Dra. Esther Casanueva
Vocal	Dra. Elizabeth Vargas de Frias
Vocal	Dr. Manuel Grillo
Vocal	Lic. Zayda Gotera de Prado
Vocal	Dr. Héctor Araya
Vocal	Dra. Olga María Amancio
Vocal	Dr. Carlos Hernán Daza
Presidente Saliente	Dr. Eleázar Lara Pantin

DIRECTORIO DE ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION

Editor General	Dr. Virgilio Bosch Román
Editor Asociado	Dr. José Félix Chávez Pérez

MIEMBROS DEL CUERPO EDITORIAL PERIODO 1995 - 1997

Dr. Juan de Dios Alvarado	Dra. María L. P. Martín de Portela
Dr. Héctor Araya	Dr. Julio Sergio Marchini
Dr. Manuel Amador	Dr. Reynaldo Martorell
Dr. Jaime Ariza M.	Dr. Manolo Mazariegos
Dr. José María Bengoa	Dr. Luis A. Mejía
Lic. Adriana Blanco M.	Dra. Josefina Morales
Dr. Héctor Bourges R.	Dr. Mario Molina
Dr. Ricardo Bressani	Dr. Santiago Muzzo
Dr. Odoardo Brito A.	Dra. Nelly Pak
Dr. Jesús Bulux	Dra. Myriam Puig A.
Dr. Benjamín Caballero	Dra. María Ester Río
Dra. Sara J. Closa	Dra. María Elena Sambucetti
Dr. Adolfo Chávez	Dra. Nora Slobodianik
Dr. Omar Dary	Dr. Benjamín Torún
Dr. Luiz G. Elías	Dr. Ricardo Uauy D.
Dr. Juan I. Egaña	Dra. Mirtha E. Valencia
Dr. Werner G. Jaffé	Dr. Mauro Valencia J.
Dra. Elena Hurtado	Dr. Tomás Walter
Dr. Miguel Layrisse	Dr. Enrique Yáñez S.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Contenido

	Páginas
EDITORIAL	257
ARTICULOS GENERALES	
Defining cooking salt intakes for patient counselling and policy making Claudia P. Sánchez-Castillo and W. Philip T. James.....	259
Pasado y presente en el diseño de fórmulas infantiles Patricia Ana Ronayne de Ferrer.....	265
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Nutrición Humana	
Desarrollo de un programa para la valoración del estado nutricional del lactante y del niño de corta edad por ordenador Ma. Carmen Rodríguez, Ignacio Coupeau, Jesús Larralde , y Alfredo Martínez J.....	274
Indicadores braquiales de grasa y músculo de escolares de una comunidad rural según el grupo social (General Lavalle, Buenos Aires, Argentina) Andrés Guillermo Bolzán y Luis Manuel Guimarey	281
Bioquímica Nutricional	
Changes of serum lipids in vitamin K3 (menadione) treated rats Alarcón O.M., Reinoso F.A., Silva L., T.M., Padrón F., A.....	286
Influencia de la ingesta de aceites vegetales en la absorción intestinal de glucosa in vitro en hamster dorado Iris González Barra, Marcela Escobar y Mauricio Villarroel Guerra.....	290
Polyunsaturated fatty acid deficiencies: effects on hepatic plasma membrane fatty acid composition and enzyme activity Angulo G.O.....	295
Interação de zinco e vitamina A em ratos na lactação. Modelo de deficiência experimental Lucia Kiyoko Ozaki Yuyama y Silvia Maria Franciscato Cozzolino.....	305
Ciencias de Alimentos	
Extraction, purification and some partial characterization of α-amylase inhibitors from wheat Iapar 28-Igapó Neide Kiyoko Kondo, Elza Iouko Ida.....	310
Control de la actividad proteolítica en ensilado de pescado Tomé Elisabetta, Levy Benschimol Abraham, Bello Rafael Antonio.....	317
Tecnología de Alimentos	
Uso del germen desgrasado de maíz en harinas compuestas para panificación Marisela Granito, Marisa Guerra.....	322
Desarrollo de un picadillo de humedad intermedia para ancianos con base en soya texturizada Josefina C. Morales de León, Patricia Cecin Salomón y Ma. de la Luz Crail Chávez.....	329
LatinFoods: Composición de Alimentos	
Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.) Helena T. Godoy , and Delia B. Rodriguez Amaya.....	336
NOTAS	340
NUEVOS LIBROS	343
INFORMACION PARA LOS AUTORES	344
INDICE GENERAL DEL VOLUMEN 45, 1995	350
INDICE DE AUTORES	354
INDICE DE MATERIAS	360