

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 64

MARZO 2014

Nº 1

Contenido

	Páginas
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
Nutrición Materna	
Comparación entre los niveles de prolactina de madres en relactancia y madres con lactancia materna exclusiva <i>Isabel Cluet de Rodríguez, María del Rosario Rossell-Pineda, Thais Álvarez de Acosta, Rosanny Chirinos</i>	1
Nutrición Experimental	
Prevalencia de deficiencia y consumo de hierro, zinc y cobre en mujeres chilenas en edad fértil. <i>María F. Mujica-Coopman, Angélica Borja, Fernando Pizarro, Manuel Olivares</i>	9
Bioquímica Nutricional	
Efectos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la pulpa de mango (<i>Mangifera indica</i> cv. Azúcar) en la carcinogénesis de colon <i>Andrea Corrales-Bernal, Luz Amparo Urango, Benjamín Rojano, María Elena Maldonado</i>	16
Biomarcadores óseos y su relación con la densidad mineral ósea en adultas jóvenes y adolescentes en su primer año posparto <i>Reyna Sámano, Hugo Martínez-Rojano, Ana Lilia Rodríguez-Ventura, Estela Godínez-Martínez, Maricruz Tolentino, Gabriela López-de-Cárdenas, Fernando Isoard, Soledad de Santiago</i>	24

Nutrición y Tercera Edad

Healthy eating index of elderly: description and association with energy, macronutrients and micronutrients intake

Vera Elizabeth Closs, Ana Maria Pandolfo Feoli, Irenio Gomes, Carla Helena Augustin Schwanke..... 34

Microbiología de Alimentos

Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA

Heriberto Franco, Aracelly Vega, Stephany Reyes, Javier De León, Alexis Bonilla 42

Ciencia de Alimentos

Capacidad antioxidante de subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

Ofelia Araceli López-Mejía, Aurelio López-Malo, Enrique Palou 50

Tecnología de Alimentos

Folates retention in brassica vegetables consumed in Brazil after different cooking methods

Ceres M. Della Lucia, Elizangela Rodrigues Da Silva Mota, Tatiana Aguiar Montini, Sônia M. R. Ribeiro, José Benício P. Chaves, Helena M. Pinheiro-Sant'Ana 59

NUEVOS LIBROS..... 69

INFORMACION PARA LOS AUTORES 70

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the Latin American Society of Nutrition

VOL 64

MARCH 2014

Nº 1

Contents

	Pages
RESEARCH PAPERS	
Maternal Nutrition	
Comparison between levels of prolactin of mother in relactation and exclusive breast feeding mothers <i>Isabel Cluet de Rodríguez, María del Rosario Rossell-Pineda, Thais Álvarez de Acosta, Rosanny Chirinos</i>	1
Experimental Nutrition	
Prevalence of deficiency and dietary intake of iron, zinc and copper in Chilean childbearing age women <i>María F. Mujica-Coopman, Angélica Borja, Fernando Pizarro, Manuel Olivares</i>	9
Nutritional Biochemistry	
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> effects of mango pulp (<i>Mangifera indica</i> cv. Azucar) in colon carcinogenesis <i>Andrea Corrales-Bernal, Luz Amparo Urango, Benjamín Rojano, María Elena Maldonado</i>	16
Bone biomarkers and its relation with bone mineral density in adults and adolescents during the first year postpartum <i>Reyna Sámano, Hugo Martínez-Rojano, Ana Lilia Rodríguez-Ventura, Estela Godínez-Martínez, Maricruz Tolentino, Gabriela López-de-Cárdenas, Fernando Isoard, Soledad de Santiago</i>	24

Nutrition and The Elderly

Healthy eating index of elderly: description and association with energy, macronutrients and micronutrients intake

Vera Elizabeth Closs, Ana Maria Pandolfo Feoli, Irenio Gomes, Carla Helena Augustin Schwanke 34

Food Microbiology

Levels of Ochratoxin A and total Aflatoxins in Panamanian exportation coffee by an ELISA Method

Heriberto Franco, Aracelly Vega, Stephany Reyes, Javier De León, Alexis Bonilla..... 42

Food Science

Antioxidant capacity of byproducts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds.

Ofelia Araceli López-Mejía, Aurelio López-Malo, Enrique Palou 50

Food Technology

Folates retention in brassica vegetables consumed in Brazil after different cooking methods

Ceres M. Della Lucia, Elizangela Rodrigues Da Silva Mota, Tatiana Aguiar Montini, Sônia M. R. Ribeiro, José Benício P. Chaves, Helena M. Pinheiro-Sant'Ana 59

NEW BOOKS 69

INFORMATION FOR AUTHORS 70

Comparación entre los niveles de prolactina de madres en relactancia y madres con lactancia materna exclusiva

Isabel Cluet de Rodríguez, María del Rosario Rossell-Pineda, Thais Álvarez de Acosta, Rosanny Chirinos

Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. Universidad del Zulia. Maracaibo - Venezuela.
Postgrado de Puericultura y Pediatría. Universidad del Zulia. Maracaibo - Venezuela.

RESUMEN. Estudio no experimental, prospectivo, comparativo y longitudinal, realizado con el objetivo de comparar los niveles de prolactina en 15 madres (Grupo estudio) con más de dos semanas de haber suspendido la lactancia materna y entrenadas para relactar según método recomendado por Organización Mundial de la Salud: Estimulación del pezón y del pecho, Técnica de chorrear y gotear y Extracción mecánica y manual y en 25 madres (grupo control) que lactaban en forma exclusiva, cuyos hijos menores de seis meses, fueron hospitalizados por diversas patologías, en la División Pediátrica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, desde noviembre 2010 a octubre 2011. Las madres tuvieron entre 15 y 25 años de edad en ambos grupos ($p=0,58$); la causa principal del abandono de la lactancia fue escasa producción láctea (46,67%). El tiempo de aparición de la secreción láctea fue de $6+1,60$ días. Los niveles de prolactina de madres del grupo estudio en las primeras 24 horas del ingreso del lactante fue $35,58+18,04$ ng/ml y en el grupo control $129,83+35,01$ ng/ml, estadísticamente significativo ($p=0,01$). Iniciada la secreción láctea fue de $121,20+16,90$ ng/ml, estadísticamente significativo ($p=0,01$) comparado con el valor inicial del grupo estudio, pero al comparar con el grupo control fue estadísticamente no significativo ($p=0,13$). Se concluye que en este grupo de madres que abandonaron la lactancia, una vez iniciada la relactación presentaron un aumento significativo de los niveles de prolactina, similares a los niveles en madres lactando en forma exclusiva.

Palabras clave: Madres en relactación, niveles de prolactina, lactancia exclusiva.

SUMMARY. Comparison between levels of prolactin of mother in relactation and exclusive breast feeding mothers. Not experimental, prospective, comparative, and longitudinal study conducted in order to compare the levels of prolactin in 15 mothers (study group) with more than two weeks of having suspended the breastfeeding, and trained to relactate according to the method recommended by World Health Organization: nipple and breast stimulation, technique of dripping and drip and mechanical and manual removal, and 25 mothers (control group) that breastfeeding exclusively, whose children less than six months, were hospitalized with various diseases, in the Division of Pediatric of University Hospital in Maracaibo, from November 2010 to October 2011. The mothers had between 15 and 25 years of age in both groups ($p=0.58$), the main cause of the abandonment of breastfeeding was insufficient milk production (46.67%). The time of occurrence of milk secretion was $6+1.60$ days. Prolactin levels in the study group mothers in the first 24 hours of admission was $35.58+18.04$ ng/ml, and in the control group $129.83+35.01$ ng/ml, statistically significant ($p=0.01$). Initiated the milk secretion was $121.20+16.90$ ng/ml, statistically significant ($p=0.01$ compared to base line study group, but when was compared to the control group was not statistically significant ($p=0.13$). It concludes that in this group of mothers who left nursing, once started relactation had significantly higher prolactin levels, similar to the levels in mothers exclusively breastfeeding.

Key words: Mother in relactation, prolactin levels, exclusive breastfeeding

INTRODUCCIÓN

La alimentación del lactante y del niño menor de dos años es fundamental para mejorar la supervivencia infantil y fomentar un crecimiento y desarrollo saludables, reduciendo la morbilidad y la mortalidad, así como el riesgo de enfermedades crónicas. De hecho, las prácticas óptimas de lactancia materna y alimenta-

ción complementaria pueden salvar cada año la vida de 1,5 millones de menores de 5 años. La Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia UNICEF recomiendan el inicio inmediato de la lactancia materna en la primera hora de vida, lactancia exclusivamente materna durante los primeros 6 meses de vida, introducción de alimentos complementarios seguros y nutricional-

mente adecuados a partir de los 6 meses, continuando la lactancia materna hasta los 2 años o más (1).

Aun así, a muchos niños se les interrumpe la alimentación al pecho en las primeras semanas o meses y como resultado, tienen incrementado el riesgo de enfermedad, malnutrición y muerte. Sin embargo, la alimentación al pecho puede ser restablecida cuando la producción de leche ha disminuido, la lactancia ha sido suspendida o no se ha podido iniciar en una mujer que ha estado embarazada, este proceso es conocido como relactancia, a diferencia de la lactancia inducida que consiste en estimular la producción de leche en una mujer que no ha estado embarazada, como por ejemplo, en una madre adoptiva (1,2). Entonces, la relactancia surge como una posibilidad importante de mejorar el pronóstico en el manejo del niño enfermo y una excelente posibilidad de prevención de la enfermedad en los pacientes pediátricos (1).

En relación a las posibilidades de éxito en la relactancia, estas son mayores cuando el tiempo transcurrido después del parto es más corto y existe una menor involución de la glándula mamaria. La técnica se basa en estimular la producción de leche mediante la succión frecuente del pezón y el vaciamiento adecuado del pecho. La composición de la leche obtenida mediante relactación no es diferente de la leche que se produce en el puerperio (3).

La producción de una cantidad suficiente de leche para alimentar a un niño requiere: Crecimiento de los alvéolos secretorios en el tejido glandular de la mama, secreción de leche por las células de éstos, y vaciamiento de la leche por el niño, aspectos en donde la prolactina desempeña un papel fundamental, actuando por lo general, junto con los estrógenos, la progesterona y otras hormonas, las cuales pueden producirse en la placenta o en el ovario (4-6).

Se conoce que la prolactina se produce en respuesta a la estimulación del pezón y de la areola por la succión. Los impulsos nerviosos sensitivos provenientes del pezón se conducen a la base del cerebro y hacen que la parte anterior de la hipófisis la secrete. Igualmente, ésta también estimula a las células para producir proteínas lácteas y lactosa y a secretar leche siendo la respuesta mayor durante la noche que durante el día (7-10). Sin embargo, también es efectiva la expresión manual o mecánica de los pechos (11).

Así mismo, las concentraciones de prolactina aumentan mucho durante el embarazo y alcanzan un má-

ximo al finalizar, momento en el cual declinan, a menos que la madre amamante al lactante. En mujeres que amamantan, pueden aumentar 10 a 100 veces en los 30 minutos que siguen a la estimulación. Esta respuesta se hace menos pronunciada luego de varios meses de alimentación al seno materno y las concentraciones de prolactina disminuyen (4,12). Al igual que todas las otras hormonas de la parte anterior de la hipófisis, la prolactina se secreta de una manera pulsátil. No obstante, al contrario de otras hormonas hipofisarias, el control hipotalámico de la secreción de prolactina es predominantemente negativo. La prolactina no estimula la síntesis y secreción de hormonas en sus células blanco, de este modo, no está sujeta a retroalimentación por agentes sintetizados en la periferia. (13)

En la relactación, el tiempo que se requiere para que comience la producción de leche materna varía entre unos pocos días y unas pocas semanas y es difícil de predecir (14,15). Se describe que algunas mujeres nunca producen suficiente cantidad de leche para establecer o restablecer la alimentación exclusiva al pecho, teniendo que complementar la alimentación del niño con fórmulas, pero otras consiguen un suministro completo en pocos días (15,16).

En Venezuela, la desnutrición es un grave problema de salud que afecta a la mayoría de los niños que habitan en las zonas menos favorecidas desde el punto de vista socioeconómico, especialmente en los lactantes, a pesar de existir programas de lactancia, el abandono de la misma y el inicio de la alimentación complementaria con alimentos no adecuados es común en la población infantil.

Tomando en cuenta el planteamiento anterior, en la Unidad de Capacitación para la Atención Integrada a las Enfermedades Prevalentes de la Infancia (UCAIEPI) de la Emergencia de Pediatría del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), desde hace más de un quinquenio se ha implementado la relactancia como una estrategia para apoyar a las madres que han abandonado la lactancia materna, ya que un alto porcentaje de los niños que ingresan a esta Unidad, son destetados en forma precoz, lo cual contribuye a elevar el índice de morbimortalidad infantil. En vista de que la relactancia es prácticamente del quehacer diario en la Unidad mencionada, se planteó la realización de este trabajo con el objetivo de determinar los niveles de prolactina en madres que abandonaron la práctica de lactancia y que

actualmente se encuentran en relactación, comparándolos con los niveles de prolactina de madres de niños menores de seis meses que reciben lactancia materna de forma exclusiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo no experimental, prospectivo, comparativo y longitudinal, para el cual se seleccionó un total de 40 madres de niños menores de seis meses, de ambos géneros, que fueron hospitalizados por diversas patologías en la División Pediátrica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. La muestra fue dividida en dos grupos, el grupo estudio compuesto por 15 madres que habían suspendido la lactancia materna y que fueron entrenadas para relactar y el grupo control conformado por 25 madres que lactaban a sus hijos en forma exclusiva. Dicho estudio fue realizado en el lapso comprendido de noviembre 2010 a septiembre del 2011. Fueron excluidas aquellas madres que tuvieron menos de 2 semanas sin lactar, madres con patología mamaria y con hijos mayores de 6 meses.

Para la recolección de datos se diseñó un instrumento, donde se incluyeron los siguientes indicadores como: edad materna, edad del niño, causa de abandono de la lactancia materna, número de hijos y patología de ingreso del niño, el tiempo que tenían las madres sin lactar, el tiempo de aparición de la secreción láctea iniciada la relactancia y los niveles de prolactina al ingreso al estudio en ambos grupos de madres y al aparecer la secreción láctea en las madres del grupo estudio.

A todas las madres se les solicitó el consentimiento informado al ingreso del niño al hospital. Para la determinación de prolactina se extrajeron 5cc de sangre periférica recolectada en tubos de ensayo Vacutainer® y fue procesada en la sección de hormonas del Laboratorio del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. La muestra fue centrifugada a 5.000 rpm para separar el suero, se almacenaron a una temperatura entre 2 y 8°C hasta ser procesadas en un Analizador de Inmunoensayo tipo ELECYs 1010/2010 MODULAR ANALYTICS E 170, mediante el método de inmunoensayo de electroquímico-luminiscencia (ECLIA). Los niveles se expresan en ng/ml, siendo los valores normales para el laboratorio de 2,1–47,6 ng/ml en mujeres no embarazadas.

Se utilizaron las recomendaciones prácticas para la

relactación según la Organización Mundial de la Salud, las cuales fueron: Estimulación del pezón y del pecho: consistió en colocar al lactante al pecho frecuentemente, exactamente cada 2 horas, 8 veces al día cada 24 horas. Las madres dieron de mamar a sus hijos de ambos pechos, 10 a 15 minutos en cada uno y se eliminaron chupones y teteros. Simultáneamente, se utilizó la Técnica de chorrear y gotear: Las madres dejaron que su leche o fórmula de inicio goteara sobre sus pechos mientras el niño se encontraba succionando.

Extracción mecánica y manual: Esta se utilizó en los lactantes de bajo peso y prematuros, donde las madres se extrajeron leche de forma manual y otras con sacaleches manuales 12 veces al día.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba “t” de Student. Se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión (media y desviación estándar), siendo significativo cuando $p < 0,05$. Los resultados se presentan en valores absolutos y porcentuales en tablas y gráficos.

RESULTADOS

De acuerdo a la distribución de la edad materna, en el grupo estudio el 46,67% (7/15) correspondió a madres entre 15 y 25 años, el 33,33% (5/15) de madres entre 26 y 30 años, el 13,33% (2/15) de madres entre 31 y 35 años, y el 6,67% (1/15) de madres entre 36 y 40 años. Mientras que en el grupo control el 52,00% (13/25) son madres en edades comprendidas entre 15 y 25 años, seguidas de 24,00% (6/25) de madres entre 26 y 30 años, el 16,00% (4/25) de madres entre 31 y 35 años, y el 8,00% (2/25) de madres entre 36 y 40 años. El valor promedio de la edad de las madres en relactancia fue de 26+1,16 años y en las madres del grupo control fue de 27+5,53 años. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios de ambos grupos ($p=0,58$).

En relación a la edad de los hijos de las madres del grupo estudio, el 46,67% (7/15) de los hijos de las madres del grupo estudio fueron menores de 1 mes de edad, el 26,67% (4/15) estuvieron entre 2 y 3 meses de edad, el 20,00% (3/15) entre 4 y 5 meses, y el 6,66% (1/15) fueron mayores de 5 meses. En el grupo control el 44,00% (11/25) eran menores de 1 mes, 40,00% (10/25) entre 2 y 3 meses, y el 16,00% (4/25) entre 4 y 5 meses; la edad promedio fue de $2 \pm 1,9$ meses en los hijos del grupo estudio y de $1,84 \pm 1,5$ en

los hijos del grupo control, siendo estadísticamente no significativo ($p=0,68$).

La Tabla 1, muestra las causas por las cuales las madres del grupo estudio habían dejado de amamantar, destacándose que el 46,66% (7/15) de ellas lo hicieron por escasa producción, seguido de 26,67% (4/15) por trabajo materno, el 20,00% (3/15) por patología del bebé, y 6,67% (1/15) debido a inversión del pezón.

Según el número de hijos de las madres, en las madres del grupo estudio correspondió a 33,33% (5/15) para uno y dos, 46,67% (7/15) para tres y cuatro hijos, 13,33% (2/15) para cinco y seis hijos y 6,67% (1/15) para siete y ocho hijos. En el grupo control el número de hijos fue de 48,00% (12/25) para uno y dos hijos, 44,00% (11/25) para tres y cuatro hijos, 4,00% (1/25) entre cinco y seis hijos, y 4,00% (1/25) entre siete y ocho hijos. El valor promedio fue de $3+1,80$ hijos en el grupo estudio y de $2,60+1,50$ hijos; no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios de ambos grupos ($p=0,41$).

En la tabla 2, se evidenció que el 100% de las causas de hospitalización de los hijos de las madres del grupo estudio correspondieron a causas infecciosas (40,00% (6/15) Bronquiolitis complicada con neumonía, 26,67% (4/15) sepsis con meningitis bacteriana aguda, 26,67% (4/15) con diarrea, 6,66% (1/15) infección por citomegalovirus), mientras que sólo el 20,00% de las causas de ingreso en los hijos de las madres del grupo control fueron infecciosas (bronquiolitis complicada con neumonía y sepsis con meningitis) y el 80,00% correspondió a causas no infecciosas (24,00% (6/25) correspondió a hidrocefalia asociado a mielomeningocele, 20,00% (5/25) disfunción valvular mecánica, 16,00% (4/25) traumatismo craneoencefálico, 16,00% (4/25) cardiopatías congénitas (4/25), 12,00% (3/25) sepsis con meningitis, 8,00% (2/25) bronquiolitis complicada con neumonía, 4,00% (1/25) síndrome melanocítico).

TABLA 1 Causas de abandono de la lactancia materna en madres del grupo estudio

Causas	n	%
Escasa producción	7	46,67
Trabajo materno	4	26,67
Patología del bebé	3	20
Inversión del pezón	1	6,66
TOTAL	15	100

Fuente: Instrumento de recolección de datos. 2010-2011

El tiempo de aparición de la secreción láctea en madres del grupo estudio tuvo un promedio de $6,00 + 1,60$ días con valor mínimo de 4 y el valor máximo de 9 días.

Los niveles de prolactina de las madres del grupo estudio, en las primeras 24 horas de ser hospitalizados sus hijos, tuvieron un valor promedio de $35,58 + 18,04$ ng/ml, con un valor mínimo de 25,58 ng/ml y máximo de 58,90 ng/ml; en las madres del grupo control fue de $129,83 + 35,01$ ng/ml, con valor mínimo 115,37 y máximo de 223,00 siendo estadísticamente significativo ($p=0,00$).

Los niveles de prolactina al inicio de la secreción láctea en las madres del grupo estudio, tuvieron un valor promedio de $121,20 + 16,90$ ng/ml, con valor mínimo de 90,00 ng/ml y máximo de 155,00 ng/ml. Al ser comparado con el valor promedio de las madres del grupo control, el cual fue de $129,58 + 35,01$ ng/ml, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios de ambos grupos ($p=0,13$). (Figura 2)

Los niveles de prolactina al ingreso de los niños y al aparecer la secreción láctea en las madres del grupo estudio, evidenciaron un valor promedio de $35,58 + 16,44$ ng/ml y un valor promedio de $121,20 + 16,90$ ng/ml respectivamente, estadísticamente significativo ($p=0,00$). (Figura 3)

En el 100% de las madres que participaron en el grupo estudio, la relactancia fue exitosa.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, en relación a la edad materna no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de madres en relactancia y el grupo control, formado en su mayoría por mujeres menores de 25 años; resultados similares a los reportados en Venezuela, por Fuenmayor J y col (7) y Álvarez T y col (10).

TABLA 2 Causas de hospitalización de los hijos de las madres del grupo estudio y madres del grupo control

Causas de hospitalización	Grupo Estudio		Grupo Control	
	n	%	n	%
Infecciosas	15	100	20	80
No Infecciosas	0	0	5	20
Total	15	100	25	100

Fuente: Instrumento de recolección de datos. 2010-2011

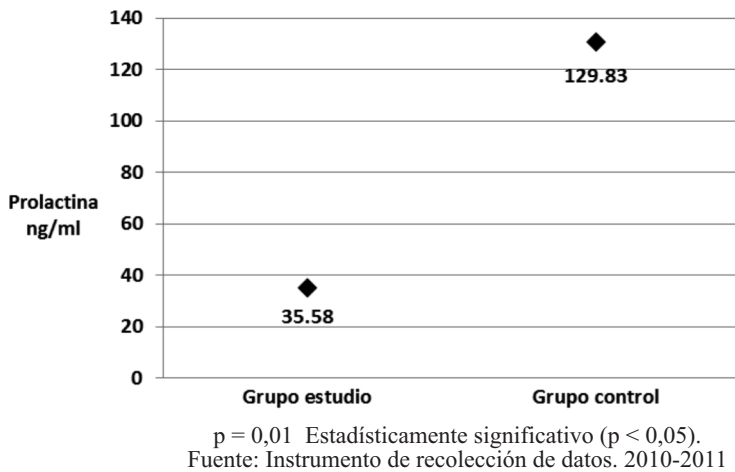


FIGURA 1 Valores promedio de los niveles de prolactina en las madres del grupo estudio y del grupo control tomados en las primeras 24 horas de haber sido hospitalizados los niños.

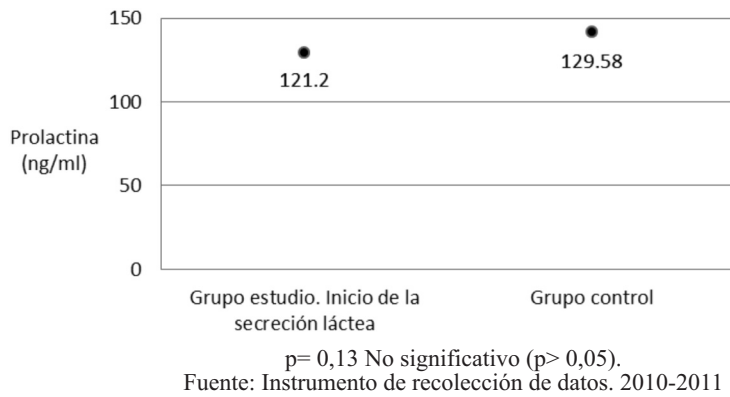


FIGURA 2 Valor promedio de los niveles de prolactina en las madres del grupo estudio al inicio de la secreción láctea y en las madres del grupo control

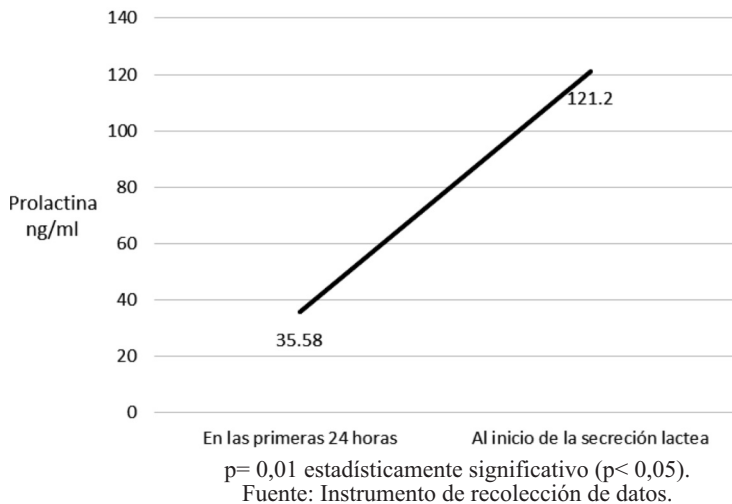


FIGURA 3 Valor promedio de los niveles de prolactina en las madres del grupo estudio en las primeras 24 horas y al inicio de la secreción láctea

En cuanto a la edad de los hijos de las madres en relactancia y las madres del grupo control, el mayor porcentaje correspondió a lactantes menores de 1 mes para ambos grupos, con un valor promedio de 2+1,90 meses en hijos de madres del grupo estudio y de 1,84+1,50 meses en los hijos de madres del grupo control. Estos resultados son diferentes a los observados en estudio de Fuenmayor J y col (7) donde la edad de los lactantes osciló entre 1 y 5 meses con un promedio de 3,00+2,00 meses de edad, pero muy similar a lo evidenciado en estudio de Álvarez T y col (10), donde el valor promedio de la edad de los hijos de las madres en relactancia fue de 2,40+0,90 meses.

En este estudio las madres dejaron de amamantar a sus hijos a muy temprana edad ya que la mayoría tenía menos de 1 mes, hecho que repercutió positivamente sobre la relactación, no presentándose dificultades para reiniciar la lactancia en ninguna de estas madres. Auerbach K y Avery J (8) informaron que los lactantes menores de 3 meses de edad estuvieron más dispuestos a aceptar el pecho que aquellos que tenían más de 3 meses, observando una línea divisoria a las 8 semanas en lactantes adoptados. El 90% de los lactantes menores de 1 semana, el 75% de los lactantes entre 1 y 8 semanas, y sólo el 51% de aquellos mayores de 8 semanas, mamaron bien la primera vez que fueron puestos al pecho.

Los lactantes pueden no estar dispuestos a mamar de un pecho que produce poca cantidad de leche, excepto en las 2 ó 3 primeras semanas de vida. Banapurmath CR y col (15) observaron que 4 de 5 madres adoptivas que tuvieron éxito con la lactancia inducida, comenzaron cuando sus lactantes tenían menos de 3 semanas de edad, mientras que 4 de 5 que no tuvieron éxito comenzaron sólo después que sus niños fueron mayores de 3 semanas de edad. Sin embargo, la relactación es posible con niños mayores, particularmente

si el niño quiere mamar y toma la iniciativa; en Perú, Marquis GS y col (16), observaron que las madres relactaron a niños mayores de 12 meses de edad.

El 46,67% de las madres del grupo estudio presentaron escasa producción de leche materna, siendo esta la causa principal para el abandono de la misma, similares resultados se observaron en estudio publicado en el 2010 por Álvarez T y col (10). Se evidenció que en su mayoría predominaron las causas maternas, seguidas de trabajo de la madre e inversión del pezón y solo un 20% correspondieron al lactante. Fuenmayor J y col (7), reportan que el trabajo y el estudio materno fueron factores determinantes para abandonar la lactancia. Las causas de abandono de la lactancia materna pueden ser diversas y dependen de factores socioeconómicos y culturales (8,9). Algunas veces la razón está relacionada con el lactante, tal es el caso de la prematuridad, la cual puede condicionar un retardo en iniciar la lactancia materna, presencia de enfermedades en el lactante, problemas anatómicos como paladar hendido y labio leporino entre otras situaciones (8).

En relación a la edad del niño cuando dejó de lactar se evidenció un valor promedio de $1,20 \pm 1,01$ meses. Auerbach K y Avery J (8) encontraron que la probabilidad de inducir la lactancia totalmente, fue menor para las mujeres que nunca habían estado embarazadas o de lograr la relactación en aquellas con embarazos anteriores que nunca amamantaron, en comparación con las mujeres que habían amamantado previamente, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. También fue menos probable que estas mismas mujeres produjesen leche usando estimulación mecánica antes de amantar a sus hijos adoptivos. Si una madre adoptiva amamantó previamente, es probable que produzca leche en los primeros 10 días. Nemba K (9) encontró que 11 de 12 mujeres que no habían lactado previamente consiguieron una lactancia adecuada, 5 a 13 días después de comenzar un protocolo para inducir la lactancia. Seema A y col (14), reportaron que 46 de 50 madres tuvieron éxito en relactar en el puerperio a sus propios hijos, no encontraron diferencias entre madres primíparas y múltiparas.

Las causas de hospitalización de los hijos de las madres en relactancia fueron en un 100,00% debido a causas infecciosas, estuvieron asociadas a Bronquiolitis complicada con neumonía, sepsis más meningitis bacteriana aguda, diarrea e infección por

citomegalovirus; mientras que en el grupo control, el ingreso se debió en su mayoría (80%) a causas no infecciosas como hidrocefalia con mielomeningocele, disfunción valvular mecánica, traumatismo craneoencefálico y cardiopatías congénitas y sólo el 20% fueron por causas infecciosas apreciándose que la lactancia materna tiene un efecto favorable sobre el sistema inmunológico del lactante.

Resultados similares se observaron en el estudio de Fuenmayor J y col (7), donde las diarreas y las afecciones respiratorias fueron las enfermedades más frecuentes; obviamente si el lactante no ha recibido una lactancia materna adecuada, carece de mecanismos inmunológicos competentes para defenderse de los agentes infecciosos como lo demuestran Quisber VL y col (12).

La alimentación con sucedáneos eleva el riesgo de muerte súbita del lactante, la mortalidad posneonatal durante el primer año de vida (en países desarrollados) y la mortalidad infantil en menores de 3 años. Los lactantes alimentados con fórmulas artificiales tienen más procesos infecciosos (fundamentalmente gastroenteritis, infecciones respiratorias e infecciones de orina), los cuales son más graves y generan más hospitalizaciones en comparación con los niños que son alimentados con lactancia materna exclusiva. Al mismo tiempo se describe que los niños no amamantados padecen más dermatitis atópica, problemas respiratorios y asma, si pertenecen a una familia de riesgo alérgico. El 83 % de los casos de enterocolitis necrosante son debidos a la alimentación neonatal con sucedáneos de leche materna (1).

Se admite a menudo que cuánto más corto es el intervalo desde la última vez que una mujer amamantó a un niño, más probable será que relacte. Los informes de los países industrializados avalan esto, pero otros países en desarrollo indican que la relactación puede ocurrir 15 a 20 años después que la mujer haya amamantado al último niño, incluso después de la menopausia (17).

En cuanto al tiempo de aparición de la secreción láctea en madres en relactancia, este tuvo un valor promedio de $6 \pm 1,60$ días. Fuenmayor y col (7) en su estudio demostraron un promedio de inicio de la producción de la leche muy similar de $6,60 \pm 2,40$ días. Otros investigadores establecen que el tiempo que se requiere para que comience la producción de leche materna varía entre unos pocos días y unas pocas se-

manas, y es difícil de predecir. Algunas mujeres nunca producen suficiente cantidad de leche para establecer o reestablecer la alimentación exclusiva al pecho, pero otras consiguen un suministro completo en pocos días (17).

En relación al valor promedio de prolactina en las primeras 24 horas del ingreso del niño, en las madres en relactancia, este fue de $35,58 \pm 16,44$ ng/ml y estuvo dentro de los valores normales de referencia para mujeres no embarazadas ($2,1 - 47,6$ ng/ml), con una disminución estadísticamente significativa ($p=0,0001$) en comparación con el valor promedio de prolactina en las madres que se encontraban lactando ($129,83 \pm 35,01$ ng/ml) (Figura 1). Powe C y col (11), establecieron que el aumento de los niveles de prolactina, incrementa el volumen de leche, lactosa, las concentraciones de calcio, los niveles de oligosacáridos y disminuye las concentraciones de sodio, lo que potencialmente mejora las propiedades antimicrobianas de la leche materna.

Los niveles de prolactina se producen en respuesta a la estimulación del pezón. Los impulsos nerviosos sensitivos provenientes del pezón se conducen a la base del cerebro y hacen que la parte anterior de la hipófisis secrete prolactina. La prolactina estimula el crecimiento de los alvéolos secretores. Igualmente, la prolactina también estimula a las células a producir proteínas lácteas y lactosa y a secretar leche. El estímulo más satisfactorio, es la succión del pecho por parte de niño y la respuesta es mayor durante la noche que durante el día. Sin embargo, también puede ser efectiva la extracción manual y mecánica. La extracción de cualquier cantidad de leche secretada también ayuda a incrementar y mantener la producción (5, 6, 17). Cuando la leche no se extrae y se “almacena” en el pecho, hasta el punto en que la madre siente la presión y la plenitud, se inhibe la producción posterior, por lo tanto, la succión y la extracción de la leche, son las claves para la estimulación de la producción de leche, tanto para la relactación como para la lactancia inducida (17).

En cuanto a los niveles de prolactina al inicio de la secreción láctea, se observó un valor promedio de $121,20 \pm 16,90$ ng/ml similares a los estudiados por Howie P y col (18). En la comparación entre los niveles de prolactina de madres en relactancia al inicio de la secreción láctea y madres lactando se evidenciaron valores similares. (Figura 2). Los niveles de prolactina

en las primeras 24 horas de su ingreso y al aparecer la secreción láctea en madres en relactancia aumentaron significativamente ($p=0,0001$) (Figura 3). No se encontraron trabajos actuales referentes a niveles de prolactina en madres en relactancia para establecer comparaciones con respecto a este aspecto.

El nivel de prolactina plasmática en la mujer no embarazada es de 10 ng/ml aproximadamente, su concentración aumenta gradualmente con el embarazo hasta 200ng/ml, pero disminuye abruptamente después del parto. En las mujeres que no amamantan este nivel regresa a 10 ng/ml en el periodo de 2 semanas (9). Quienes amamantan presentan un alza de hasta 150 ng/ml, declinando la concentración basal hasta alrededor de 50 ng/ml, entre el primero y sexto mes, aún más alta que la basal de quienes no amamantan, también se menciona que el rango de la prolactina basal de las mujeres amamantando variaba de 15 a 119 ng/ml (11,19). Esto pudiera ser explicado por el número de mamadas en 24 horas, dado que la depuración de prolactina plasmática después de una mamada toma cerca de 180 minutos (19). Howie P y col (18) observaron que aproximadamente 30 minutos de amamantamiento determinan un aumento de los niveles plasmáticos de prolactina por 3 a 4 horas, con un pico entre los 20 a 40 minutos de iniciada la secreción. La introducción de alimentación complementaria, significa una disminución de la frecuencia y duración de las mamadas además de un menor nivel de prolactina plasmática (9). Se ha observado que una mayor frecuencia de mamadas aumenta la producción de leche, y como respuesta a la succión se observa un alza de la prolactina, por lo tanto se ha asumido que es la prolactina la responsable de generar mayor producción de leche (9).

En este estudio se concluye que en este grupo de madres que abandonaron la lactancia, una vez iniciada la relactación presentaron un aumento significativo de los niveles de prolactina, similar a los niveles en madres lactando en forma exclusiva, lo cual significa una mayor producción de leche, que garantiza una lactancia materna exclusiva, durante los primeros seis meses de sus hijos.

REFERENCIAS

1. Madrigal H, Chias L. Lactancia materna, recomendación universal y controversias en su aplicación en diferentes contextos socioeconómicos. *Rev Esp Nutr Comunitaria*. 2010; 16(3):154-156.

2. Lawrence RA, Lawrence RM. Breastfeeding: A guide for the Medical Profession. 2011 Séptima Edición. United States of América, pag. 1-4. Elsevier Mosby.
3. Castillo JR, Rams A, Castillo A, Rizo R, Cádiz A. Lactancia materna e inmunidad: Impacto social. MEDISAN. 2009; 13(4):1-11. (Serie en internet). (Citado 31 de Junio 2012) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102930192009000400013&script=sci_arttext
4. García R. Composición e inmunología de la leche humana. Acta Ped Méx 2011; 32(4):223-230.
5. Kon'lla M, Shilina NM, Gmoshinskaia MV, Ivanushkina TA. Breast hormones-regulators of energy homeostasis: growth of infants. Vopr Pitan. 2011; 80(4):73-78.
6. Zanardo V, Savona V, Cavallin F, D'Antona D, Giustardi A, Trevisanuto D. Impaired lactation performance following elective delivery at term: role of maternal levels of cortisol and prolactin. J Matern Fetal Neonatal Med. 2012; 15(3): 18-23.
7. Fuenmayor J, Álvarez T, Cluet I, Rossell M. Relactancia método exitoso para reinducir el amamantamiento en madres que abandonaron la lactancia natural. An Venez Nutr. 2004; 17(1):12 – 17.
8. Auerbach K, Avery J. (1981) Extraordinary Breastfeeding: Relactation/Induced Lactation. J. Trop Paed. 1981; 27: 52-55.
9. Nemba K. Induced Lactation: A study of 37 Non-puerperal Mothers. J. Trop Pediatric. 1994; 40:240-242.
10. Álvarez T, Cluet I, Rossell M, Nucette A, Valbuena E. Determinación de las concentraciones de proteínas, hidratos de carbono y grasas en leche de madres en relactancia. Arch Latinoam Nutr. 2010; 60 (4): 368-373.
11. Powe C, Puopolo K, Newburg D, Lonnerdad B, Chen C. Effects of Recombinant human prolactin on breast milk. Pediatrics. 2011; 127(2):359-365.
12. Quisber VL. Lactancia inducida y Relactancia. 5ta Edición. 2009 9: 401-408. Distrito Federal, México. Interamericana McGraw-Hill.
13. Valdés P, Sierralta P, Barría A, Figueroa G, Berg V. Influencia de los niveles de prolactina basal y postsucción en la amenorrea de lactancia. Rev Chil Obstet Ginecol. 1991; 56(2):88-93.
14. Seema A, Patwari L, Satyanarana. Relactation: An effective Intervention to Promote Exclusive Breastfeeding. Paediatr 1997; 43: 213-216.
15. Banapurmath CR, Banapurmath S, Kesaree N. Successful induced non-puerperal lactation in surrogate mothers. Indian J. Pediatr 1993; 60(3):639-643.
16. Marquis GS, Diaz J, Bartolini R. Recognizing the reversible nature of child feeding decisions: breastfeeding, weaning and relactation patterns in a study town community of Lima, Peru. Soc Sci Med 1998; 47(3):645-656.
17. Wittig SL, Spatz DL. Induced lactation: gaining a better understanding. Am J Matern Child Nurs. 2008;33(2):76-81
18. Howie P. Breast Feeding - a New Understanding. Midwives Chronicle and Nursing Notes. Pediatrics. 1985; 21(7):12-20.
19. Cox DB, Kent JC, Casey TM, Owens RA, Hartmann PE. Breast growth and urinary excretion of lactose during human pregnancy and early lactation: Endocrine relationships. Exp Physiol. 1999; 84:412.

Recibido: 25-01-2014

Aceptado: 02-03-2014

Prevalencia de deficiencia y consumo de hierro, zinc y cobre en mujeres chilenas en edad fértil.

María F. Mujica-Coopman, Angélica Borja, Fernando Pizarro, Manuel Olivares

Laboratorio de Micronutrientes, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA),
Universidad de Chile. Chile.

RESUMEN. El objetivo del presente estudio es evaluar el estado nutricional e ingesta de hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu) en mujeres chilenas en edad fértil. Se estudió una muestra de conveniencia de 86 mujeres entre 18 a 48 años de edad de la ciudad de Santiago, Chile. El estado nutricional de Fe se determinó a través de hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio, saturación de transferrina, zinc protoporfirina, ferritina sérica (FS), Zn y Cu séricos. La ingesta dietética fue evaluada con una encuesta de frecuencia de consumo.

Un 4,7% de las mujeres presentó anemia por deficiencia de Fe, 21% deficiencia de Fe sin anemia, 26% depósitos deplegados de Fe y un 48,3% estado nutricional normal de Fe. Las mujeres obesas presentaron mayores niveles de FS ($p<0,01$) al comparar con mujeres con peso normal. Además, presentaron niveles más altos de Hb ($p<0,05$) al comparar con mujeres con estado nutricional normal y sobrepeso. El 3,5% y 2,3% de las mujeres presentó deficiencia de Zn y Cu, respectivamente. El 95%, 94% y 99% cumplió el EAR para Fe, Zn y Cu, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la ingesta de micronutrientes entre las mujeres al comparar por estado nutricional. En conclusión, un alto porcentaje de las mujeres presentó una ingesta adecuada de micronutrientes. Además existe una baja prevalencia de deficiencia de Zn, Cu y anemia. Sin embargo, un 47% presenta deficiencia de Fe en etapas anteriores a la de anemia.

Palabras clave: Hierro, cobre, zinc, anemia, mujeres en edad fértil.

SUMMARY. Prevalence of deficiency and dietary intake of iron, zinc and copper in Chilean childbearing age women.

The aim of the present study was to evaluate anemia, the biochemical status and dietary adequacy of iron (Fe), zinc (Zn) and copper (Cu), in Chilean childbearing age women. We studied a convenience sample of 86 women aged 18 to 48 years from Santiago, Chile. We determined anemia and the micronutrient status through hemoglobin (Hb) mean corpuscular volume, transferrin saturation, zinc protoporphyrin, serum ferritin (SF), serum Zn and Cu. Dietary adequacy was estimated using a food frequency questionnaire. Of all women, 4.7% had Fe deficiency (ID) anemia, 21 % ID without anemia, 26 % depleted Fe stores and 48.3% normal Fe status. Obese women had higher SF ($p<0.01$) compared with those classified as having normal BMI. Also, showed higher Hb ($p<0.05$) concentrations compared with overweight and normal weight women.

Participants showed 3.5 % and 2.3 % of Zn and Cu deficiency, respectively. Also, 95 %, 94 % and 99 % had adequate intake of Fe, Zn and Cu respectively, according to EAR cut points. There were no significant differences in micronutrients intake across different nutritional status. There was a low prevalence of anemia, Fe, Zn and Cu deficiency. A high percentage of women reached micronutrient adequacy. However, 47% of women had ID without anemia and Fe depleted stores.

Key words: Iron, zinc, copper, anemia, childbearing age women

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los países de Latinoamérica han experimentado rápidos cambios demográficos y epidemiológicos, además de una transición nutricional caracterizada por la disminución en la desnutrición y mortalidad infantil, junto con un drástico aumento en la prevalencia de malnutrición por exceso (1). Junto con lo anterior, la deficiencia de micronutrientes continúa siendo uno de los mayores problemas nutricio-

nales y de salud pública en los países en desarrollo (2). A nivel mundial, se estima que cerca de un 40% de la población padece de anemia, siendo su principal causa la deficiencia de hierro (Fe) relacionado a una inadecuada ingesta, absorción disminuida o aumento de los requerimientos de este micronutriente en grupos específicos de la población (2). Situación similar se ha reportado sobre el estado nutricional de zinc (Zn), principalmente relacionado a una inadecuada ingesta debido a la presencia de fuentes alimentarias comunes

entre estos minerales (3). Por otra parte, estudios de la región han reportado una deficiencia de cobre (Cu) cercana al 20% en mujeres en edad fértil (4,5).

Desde la década del 60 se ha reportado una conexión entre obesidad y deficiencia de Fe. La revisión realizada por Cheng y cols (6) mostró que los niños obesos mostraron menores niveles de Fe sérico al comparar con niños con estado nutricional normal. Posteriormente, estudios en adultos han reportado una asociación entre obesidad y deficiencia de Fe posiblemente debido a la alteración del metabolismo del Fe en un estado pro inflamatorio característico en la obesidad. Por otra parte, García y cols (7) mostraron que una baja ingesta o niveles de zinc (Zn) sérico disminuidos en adultos se ha asociado con un aumento en la prevalencia de obesidad y comorbilidades como diabetes y enfermedades cardíacas, mostrando niveles significativamente menores de Zn séricos en adultos obesos al comparar con sujetos con estado nutricional normal. Resultados similares fueron mostrados en un estudio realizado en niños donde los obesos mostraron niveles séricos significativamente menores de Cu y Zn al comparar con los niños no obesos (8).

Actualmente, Chile se encuentra en etapas avanzadas de la transición nutricional. Sin embargo, las deficiencias de microminerales persisten en nuestra población. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia de deficiencia e ingesta de Fe, Zn y Cu en una muestra de mujeres en edad fértil de la ciudad de Santiago de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

En una muestra por conveniencia, se estudiaron 86 mujeres aparentemente sanas entre 18 y 48 años, de nivel socio económico medio-bajo, pertenecientes a la comuna de Macul, de la ciudad de Santiago, Chile. Las participantes no presentaban antecedentes de consumo de suplementos de vitaminas o minerales 6 meses previos al estudio. Además, no presentaban diagnóstico de embarazo o encontrarse amamantando al momento del estudio.

Mediciones antropométricas

Se determinó el peso (kg) y talla (m), utilizando una balanza (0,1 kg de precisión) y tallímetro (1 cm de precisión) marca SECA. Las participantes fueron clasificadas de acuerdo al criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) con estado nutricional enflaquecida (IMC <18,5 kg/m²), normal (IMC 18,5-

24,9 kg/m²), sobrepeso (IMC 25,0-29,9 kg/m²) u obesas (IMC ≥ 30 kg/m²) (9).

Mediciones hematológicas

Después de un ayuno nocturno, a cada participante se le extrajo 15 ml de sangre. Se realizaron mediciones de hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM) (CELL-DYN 3200, ABBOTT Diagnostics, Abbott Park, IL), hierro sérico, capacidad total de unión de hierro (TIBC) y saturación de transferrina (Sat), zinc protoporfirina (Zpp) (Hematofluorómetro modelo 206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ), ferritina sérica (FS) (ELISA), Zn sérico (Espectrometro de absorción atómica, modelo 2280, The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) y Cu sérico (Espectrometro de absorción atómica, modelo 2280, The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA).

Para la evaluación del estatus de Fe se utilizaron los criterios definidos por la OMS (10,11). Anemia se definió como una Hb <12 g/L. Anemia por deficiencia de Fe como anemia más dos o más valores hematológicos anormales (VCM <80 fL, Zpp >70 µg/dLGR, Sat <15% o FS <15 µg/L). Deficiencia de Fe sin anemia como valores normales de Hb más dos o más valores hematológicos anormales y depleción de los depósitos de Fe solo como FS <15 µg/L con los otros indicadores hematológicos normales.

La deficiencia de Zn y Cu se definió con valores séricos <70 µg/dL (3) y <80 µg/dL (12), respectivamente.

Ingesta Dietaria

Se aplicó una encuesta dirigida de frecuencia de consumo (EFC) realizada por una nutricionista. Se determinó la ingesta de alimentos a través del cálculo de tamaño de porciones de alimentos, utilizando modelos o utensilios comunes de alimentación. El cálculo de la ingesta de nutrientes se realizó a través de la información contenida en la tabla chilena de composición de alimentos (13), complementado para el caso del Fe, Zn y Cu con la información obtenida en 108 preparaciones más comunes consumidas en Chile (14) y la tabla del Departamento Agricultura de Estados Unidos (USDA) (15).

El cumplimiento de la ingesta de micronutrientes se realizó a través de la comparación de las ingestas reportadas con el promedio de las necesidades estimadas (EAR), equivalente a 8,1mg/día para Fe, 6,8mg/día de Zn y 700 µg/día de Cu (16).

Análisis Estadístico

Las variables con distribución normal fueron ex-

presadas en promedios y desviación estándar (DE). Debido a que no presentaron distribución normal, las mediciones de FS, ingesta de kilocalorías, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, Fe, Zn y Cu fueron transformadas a logaritmo natural. Posteriormente para FS, se calculó el antilogaritmo y se expresó en promedio geométrico y rango ± 1 DE. Las mediciones de ingesta dietética se expresaron en mediana y rango intercuartílico (p25-p75).

Las diferencias por clasificación de estado nutricional fueron comparadas por un test ANOVA a una vía. La relación entre edad, IMC y concentración de FS se calculó a través del coeficiente de correlación de Pearson. Todas las comparaciones tuvieron un nivel de significancia del 5%. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATA 10.0 (Stata Corp, College Station, TX, USA).

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile de acuerdo a la declaración de Helsinki y el código de Nuremberg. Todas las mujeres participaron voluntariamente después de leer y firmar el consentimiento informado.

RESULTADOS

El promedio de edad de las participantes (n= 86) fue de $33 \pm 8,9$ años. No se encontraron diferencias significativas en la edad de las participantes al comparar por estado nutricional. Sin embargo se mostró una correlación positiva entre edad e IMC ($r=0,25$, $p<0,05$).

Del total de mujeres, el 33% (IC 22,8%-43,5%) presentó estado nutricional normal, el 41% (IC 31,3%-53%) sobrepeso y el 26% (IC 16,7%-36,1%) obesidad. El promedio de IMC para el total de las participantes fue de $27,8 \pm 3,9$ kg/m², mostrando un promedio de $22,8 \pm 1,3$ kg/m², $27,7 \pm 1,5$ kg/m² y $32,5 \pm 1,6$ kg/m² para mujeres con estado nutricional normal, sobrepeso y obesidad, respectivamente (Tabla 1).

La prevalencia de anemia, anemia por deficiencia de Fe, deficiencia de Fe sin anemia, depósitos depletados y estado nutricional normal de Fe fue de 4,7% (IC 1,3%-11,4%), 4,7% (IC 1,3%-11,4%), 21% (IC 13%-31%), 26% (IC 17%-36%) y 48,3% (IC 37%-59%), respectivamente (Figura 1). No se encontraron diferencias significativas en el estado nutricional de Fe al comparar por clasificación de IMC.

Los valores de los parámetros hematológicos y biomarcadores de los micronutrientes se muestran en la Tabla 2. Las obesas mostraron niveles significativamente mayores de FS al comparar con normales ($p<0,05$). De la misma forma, presentaron niveles significativamente mayores de Hb al comparar con mujeres con estado nutricional normal y sobrepeso (ANOVA de una vía, $p<0,05$). Además

TABLA 1. Características generales de las participantes

	Normal (n=28)	Sobrepeso (n=36)	Obesa (n=22)	p*
Edad (años)	$31,6 \pm 9,4$	$32,8 \pm 9,4$	$36,3 \pm 6,6$	NS
Peso (kg)	$56,6 \pm 5,3$	$69,6 \pm 5,9$	$77,8 \pm 7,6$	<0,01a
Talla (m)	$1,57 \pm 0,05$	$1,59 \pm 0,05$	$1,55 \pm 0,06$	<0,05
IMC (Kg/m ²)	$22,8 \pm 1,3$	$27,7 \pm 1,5$	$32,5 \pm 1,7$	<0,01a

Promedio \pm rango de 1 desviación estándar

*ANOVA una vía, Test post hoc Scheffé: anormal vs sobrepeso, normal vs obesa, sobrepeso vs normal $p<0,001$.

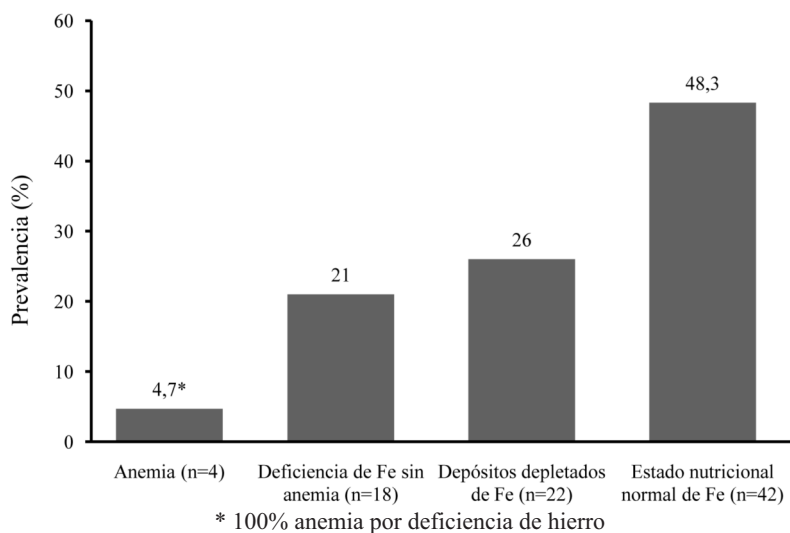


FIGURA 1. Prevalencia de anemia y estado nutricional de hierro en una muestra de mujeres chilenas en edad fértil

TABLA 2. Mediciones hematológicas

Variables hematológicas	Normal	Sobrepeso	Obesa	p **
	(n=28)	(n=36)	(n=22)	
Hemoglobina (g/dL)	14,7 ± 1,2	14,9 ± 1,4	15,7 ± 1	<0,05a
VCM (fL)	83,4 ± 4,9	83,2 ± 6,6	85,2 ± 2,7	N.S
Zpp (µg/dL GR)	84 ± 26,4	85,2 ± 30,2	71,3 ± 19,7	N.S
Hierro sérico (µg/dL)	73,2 ± 33	71 ± 28,5	74,9 ± 26,3	N.S
TIBC (µg/dL)	350,6 ± 70,8	354 ± 53,5	321,8 ± 34,9	N.S
Saturación de transferrina (%)	22,1 ± 11,1	21 ± 9,3	23,2 ± 7,4	N.S
Ferritina sérica (µg/L)*	16,1 (15,4-16,8)	24,1 (23,3-24,9)	33,4 (32,8-34)	<0,01b
Zinc sérico (µg/dL)	88,6 ± 33,7	87 ± 26,8	84,4 ± 10	N.S
Cu sérico (µg/dL)	135,4 ± 49,4	139,5 ± 46,8	120,6 ± 28	N.S

Promedio ± desviación estándar

*Media geométrica ± rango de 1 desviación estándar

**ANOVA una vía Test post-hoc Scheffé: a normal vs obesa sobrepeso vs obesabnormal vs obesa (p<0,05)

TABLA 3. Ingesta Dietética

Variables Dietéticas	Normal	Sobrepeso	Obesa	p*
	(n=28)	(n=36)	(n=22)	
Energía (kcal)	2348 (1981,3-2835,0)	2279,1 (1943,2-2761,1)	2311,2 (1912,0-3035,9)	N.S
Proteínas (g)	95,7 (82,9-117,3)	94,3 (76,3-117,5)	100,1 (77,7-107,6)	N.S
Lípidos (g)	50,4 (38,2-56,0)	40 (31,5-55,3)	43,5 (34,9-52,7)	N.S
Hidratos de Carbono (g)	370,9 (301,5-494,4)	385,2 (333,9-459,4)	384,9 (324,6-538,4)	N.S
Hierro (mg)	16,4 (13,7-20,0)	15,6 (13,2-19,8)	16,6 (14,0-20,9)	N.S
Zinc (mg)	11,3 (9,3-14,0)	11,1 (8,9-15,0)	9,9 (8,3-11,7)	N.S
Cobre (µg)	1705 (1360-2365)	1585 (1310-2070)	1790 (1450-2080)	N.S

Mediana (rango p25-p75).

*ANOVA una vía

se encontró una correlación positiva entre IMC y niveles de FS ($r=0.29$, $p<0.01$).

El 3,5% y 2,3% del total de las mujeres presentó concentraciones deficitarias de Zn y Cu séricos, respectivamente.

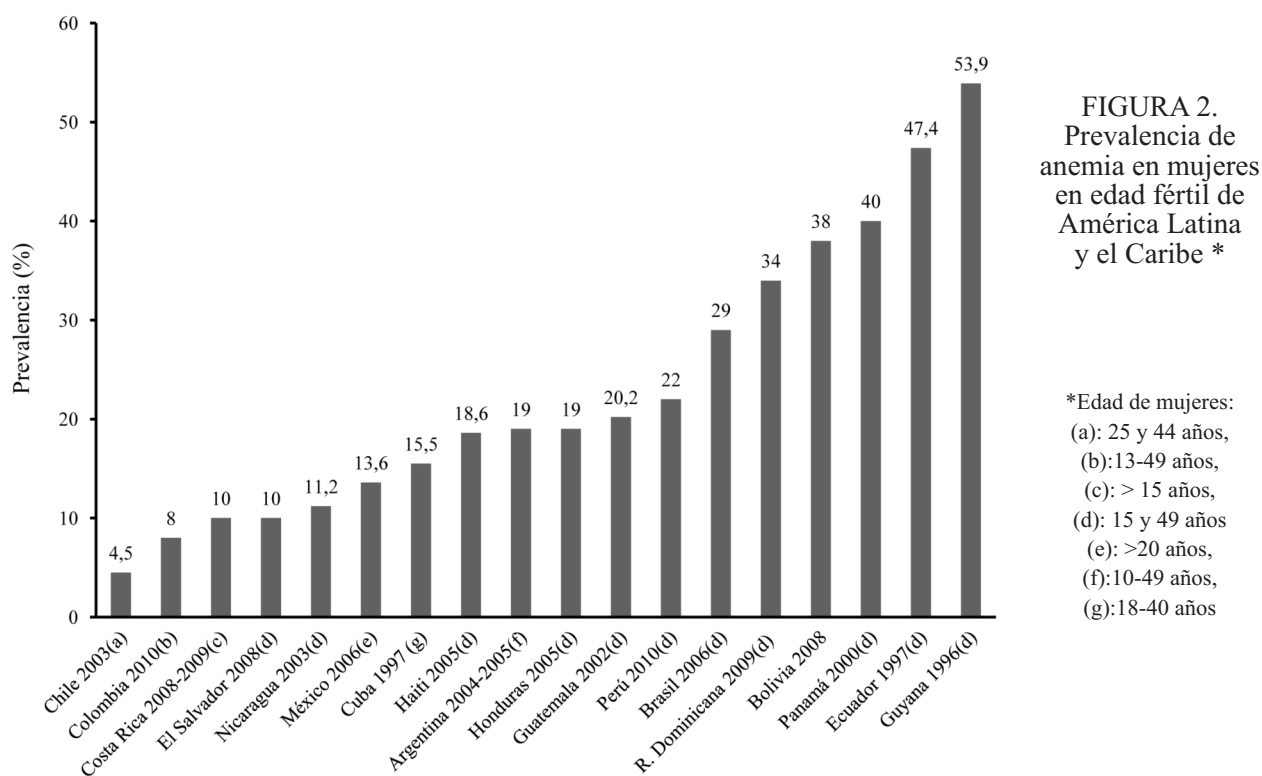
Las participantes mostraron una mediana de ingesta diaria de 2311 kcal, 95,4 g de proteínas, 45,4 g de lípidos y 381 g de hidratos de carbono. La mediana de ingesta diaria de micronutrientes fue de 16,2 mg de Fe, 11,2 mg de Zn y 1710 µg de Cu. Del total de mujeres, el 95,1%, 94% y 99% tuvo una ingesta adecuada de Fe, Zn y Cu, respectivamente. El consumo de pan

aportó un 34 %, 23,1% y 19,4% de la ingesta diaria de Fe, Cu y Zn, respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas en la ingesta de macro y micronutrientes al comparar por estado nutricional (ANOVA de una vía; NS) (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron una prevalencia del 4,7% de anemia por deficiencia de Fe en mujeres en edad fértil. Lo anterior es consistente con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud del año 2003



(17), la cual mostró una prevalencia de anemia de un 4,5% en mujeres entre 25 y 44 años, presentando la menor prevalencia de anemia entre los países latinoamericanos y el Caribe. (18-21) (Figura 2). Además, el 21% de las participantes de nuestro estudio mostró deficiencia de Fe sin anemia y el 26% depósitos depleados de Fe. Resultados concordantes fueron reportados en mujeres en edad fértil entre los años 2001-2010 (22), mostrando una prevalencia de 10% de anemia, 12% deficiencia de Fe sin anemia y 12% de depleción de los depósitos de Fe. Similar situación fue reportada en la encuesta de salud de México año 2006 (4) en este grupo, donde la prevalencia de depósitos depleados de Fe fue de un 18,1%, sin embargo la prevalencia de anemia alcanzó un 13,6%.

Una posible explicación para nuestros resultados es el adecuado aporte dietario de Fe. A pesar de que se ha comunicado que las principales fuentes alimentarias de este mineral son las carnes y vísceras (14), el mayor aporte de Fe fue a través del consumo de pan, alcanzando una ingesta promedio de 191,2 g/día. En Chile, desde el año 1967 se inició la fortificación de la harina de trigo con 30 mg de Fe/kg como sulfato ferroso, siendo una matriz alimentaria de buen aporte y absorción de Fe (~10%) (22). A pesar de lo anterior,

el aporte de Fe si bien fue suficiente para suplir las necesidades de la eritropoyesis, no ha sido suficiente para repletar los depósitos de Fe.

Por otra parte, se ha reportado que el uso continuo de tratamiento anticonceptivo hormonal reduce la incidencia de anemia, debido a la disminución de la pérdida menstrual, ocurriendo lo contrario con el uso de DIU (23). El 41% y 10% de las mujeres participantes refirió utilizar método hormonal y DIU, respectivamente. Posiblemente lo anterior contribuye a la baja prevalencia de anemia ferropriva observada en nuestro estudio.

Al comparar por estado nutricional, las mujeres obesas presentaron concentraciones significativamente mayores de Hb y FS. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la ingesta de Fe al comparar por la clasificación nutricional de las participantes. Una posible explicación a lo anterior, es el estado pro inflamatorio presente en la obesidad. Estudios realizados en niños y adultos obesos (6) han mostrado un aumento en los niveles de FS, proteína de fase aguda, y citoquinas pro inflamatorias como proteína C reactiva (PCR) e IL-6 al comparar con sujetos con estado nutricional normal. Por lo anterior, se ha recomendado determinar el estado nutricional de Fe considerando, al menos, una medición de proteínas de fase aguda, como PCR, para

ajustar el efecto de la inflamación en los biomarcadores de estado nutricional de Fe (10). Por otra parte, se ha sugerido que la presencia de comorbilidades en la obesidad, como hipoxia en tejidos secundaria a apnea, podrían aumentar los niveles de Hb (6).

En Latinoamérica se ha reportado un 42% de deficiencia de Zn en mujeres venezolanas (24) y en mujeres chilenas un 25,1% y 5,9% de deficiencia de Zn y Cu, respectivamente (5). Por otra parte, Mejía-Rodríguez y cols (4) mostraron una prevalencia de deficiencia de Zn de un 33,8% y un 16,8% de deficiencia de Cu en mujeres mexicanas >20 años, además 90,3% y 28,9% de ellas tenían una ingesta bajo EAR para Zn y Cu, respectivamente. A diferencia de lo anterior, nuestros resultados mostraron una baja prevalencia de deficiencias de Zn y Cu, lo que es consistente con el cumplimiento de la ingesta diaria de micronutrientes reportada por las participantes, principalmente a través del consumo de pan. Lo anterior, es concordante a lo reportado por Olivares y cols (14) en un estudio realizado en adultos, donde las principales fuentes de aporte a la ingesta de estos micronutrientes fueron cereales y leguminosas. Otro posible factor contribuyente a la mejoría de la nutrición de estos microminerales es el aumento del consumo de carnes durante la última década (2001-2011), consideradas un buen portador de Zn y Cu, alcanzando un consumo de 84,7 kg por habitante al año (25). Sin embargo, pudiera existir una sobreestimación del cumplimiento de ingesta, ya que el EAR considera una absorción de Zn desde la dieta de un 41% y un 18% para Fe (16), a diferencia de la recomendación de FAO/OMS (26), la cual establece una absorción de un 30% para Zn y 10% para Fe, considerando las características de la dieta consumida por las mujeres de nuestro estudio, junto con la presencia en la dieta de factores promotores e inhibidores de la absorción de estos micronutrientes.

Las fortalezas de nuestro estudio son la utilización de biomarcadores bioquímicos para la determinación del estado nutricional de Fe, Zn y Cu. Sin embargo, existen algunas limitaciones. Este estudio no contó con una muestra representativa, por lo cual no es posible inferir sobre la población de mujeres en edad fértil. Por otra parte, la medición indirecta de la ingesta dietética a través de la aplicación de una encuesta alimentaria puede generar la sub o sobreestimación de la ingesta real de nutrientes, ocurriendo esto último más frecuentemente con las encuestas de tendencia de con-

sumo. Además, no se realizaron mediciones de indicadores de inflamación que nos permitan dilucidar el efecto del estado pro inflamatorio sobre los biomarcadores de Fe, Zn y Cu utilizados.

La obesidad es el producto de un desbalance entre la ingesta alimentaria y el gasto energético. El hecho que nuestras mujeres obesas y con sobrepeso presenten un consumo similar de nutrientes puede obedecer a que éstas subestimaron su ingesta alimentaria y/o tuvieron un menor gasto energético que las normo peso, factor que no se determinó en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

Las mujeres presentaron un alto porcentaje de cumplimiento de EAR para micronutrientes. Además, existe una baja prevalencia de deficiencia de Zn, Cu y anemia ferropriva. Sin embargo, un 47% presenta deficiencia de Fe en etapas anteriores a la de aparición de la anemia.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT# 1133075)

REFERENCIAS

1. Garmendia ML, Corvalan C, Uauy R. Addressing malnutrition while avoiding obesity: minding the balance. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:513-517
2. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva (Switzerland):WHO; 2008.
3. International Zinc Nutrition Consultative Group. Technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull.* 2004; 25 Suppl 2: S91-204.
4. Mejía-Rodríguez F, Shamah-Levy T, Villalpando S, García-Guerra A, Méndez-Gómez Humarán I. Iron, zinc, copper and magnesium deficiencies in Mexican adults from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Méx*2013;55: 275-284.
5. Cediell G, Olivares M, Araya M, Letelier MA, López de Romaña D, Pizarro F. Efecto de la inflamación subclínica sobre el estado nutricional de hierro, cobre y zinc en adultos. *Rev Chil Nutr.* 2009;36: 8-14.
6. Cheng HL, Bryant C, Cook R, O'Connor H, Rooney K, Steinbeck K. The relationship between obesity and

- hypoferraemia in adults: a systematic review. *Obes Rev.* 2012;13:150-161.
7. García OP, Long KZ, Rosado JL. Impact of micronutrient deficiencies in obesity. *Nutrition reviews.* 2009; 67:559-572.
 8. Azab SF, Saleh SH, Elsaheed WF, Elshafie MA, Sherief LM, Esh AM. Serum trace elements in obese Egyptian children: a case-control study. *Ital J Pediatr.* 2014;20;40:20.
 9. World Health Organization. Report of a WHO consultation on obesity. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva, Switzerland: WHO; 2000. Technical Report Series; 894.
 10. World Health Organization. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. *Vitamin and Mineral Nutrition Information System*, 2011. Geneva, Switzerland: WHO; 2011.
 11. United Nations Children's Fund, United Nations University, World Health Organization. Iron deficiency anaemia assessment, prevention, and control: a guide for programme managers. Geneva, Switzerland: WHO; 2001.
 12. Elin RJ. Reference intervals and laboratory values. En: Cecil Textbook of Medicine. 22th ed. Goldman L, Anselio DA, editors. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2004:2496-505
 13. Gattás V. Guía de composición nutricional de alimentos naturales, de la industria y preparaciones chilenas habituales. 1th ed. Chile: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, 2006.
 14. Olivares M, Pizarro F, de Pablo S, Araya M, Uauy R. Iron, Zinc, and Copper: Contents in Common Chilean Foods and Daily Intakes in Santiago, Chile. *Nutrition.* 2004;20:205-212.
 15. Gebhardt S, Thomas R. Nutritive value of foods. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. Home and Garden Bulletin Number 72, Nutrient data laboratory. Maryland (USA):USDA; 2002.
 16. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. National Academy Press, Washington, DC, USA:IOM; 2001.
 17. Ministerio de Salud. Encuesta nacional de salud 2003. Chile: Minsal, 2003. Disponible en <http://epi.minsal.cl/Epi/Html/Invest/ENS/InformeFinalENS.pdf>. Consultado 7/11/2013.
 18. Mora JO, Boy E, Lutter C, Grajeda R. Anemia in Latin America and the Caribbean, 2009. Situation analysis, trends, and implications for public health programming. Washington DC , USA: PAHO; 2010.
 19. Ministerio de la protección social. Encuesta nacional de demografía y salud 2010. Colombia, 2010. Disponible en <http://www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR246/FR246.pdf>. Consultado 19/11/2013
 20. Pan American Health Organization. Encuesta de nutrición Costa Rica 2008-2009. Costa Rica: PAHO;2008-2009. Disponible en <http://www.paho.org>. Encuesta de nutrición Costa Rica 2008-2009. Costa Rica:PAHO;2008-2009. Consultado 19/11/2013.
 21. Ministerio de salud. Pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e da mulher 2006. Brasil: Minsal, 2006. Disponible en <http://bvsm.sau.gov.br/bvsm/pnds/index.php>. Consultado 19/11/2013
 22. Rios-Castillo I, Brito A, Olivares M, Lopez-de Romana D, Pizarro F. Low prevalence of iron deficiency anemia between 1981 and 2010 in Chilean women of childbearing age. *Salud Publica Mex.* 2013;55:478-483.
 23. Harvey L, Armah CN, Dainty JR, Foxall RJ, John Lewis D, Langford NJ, et al. Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK. *Br J Nutr.* 2005;94:557-564.
 24. Meertens L, Solano L, Sánchez A. Hemoglobina, ferritina y zinc sérico de mujeres en edad reproductiva. Su asociación con el uso de anticonceptivos. *An Venez Nutr.* 2002;15:5-10.
 25. Oficina de estudios y políticas agrarias. Consumo aparente de principales alimentos en Chile. Santiago (Chile): ODEPA; 2012. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/7004.pdf>. Consultado 24/10/2013
 26. World Health Organization and Agriculture Organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Geneva (Switzerland):WHO-FAO; 2004

Recibido: 23-01-2014

Aceptado: 27-03-2014

Efectos *in vitro* e *in vivo* de la pulpa de mango (*Mangifera indica* cv. Azúcar) en la carcinogénesis de colon

Andrea Corrales-Bernal, Luz Amparo Urango, Benjamín Rojano, Maria Elena Maldonado

Grupo Impacto de los Componentes de los Alimentos en la Salud, Escuela de Nutrición y Dietética,
Universidad de Antioquia, Colombia. Grupo Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia.

RESUMEN. La porción comestible del mango contiene ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles, terpenoides y fibra que tienen efectos protectores para la salud, y posiblemente contra el desarrollo de cáncer de colon (CCO). El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antiproliferativa en células de adenocarcinoma de colon (SW480) y preventiva en un modelo *in vivo* de CCO de un extracto acuoso de *Mangifera indica* cv. Azúcar. El contenido de fenoles totales, flavonoides y carotenoides también fue analizado. El extracto inhibió el crecimiento de las células SW480 en forma dosis-tiempo-dependiente hasta 22,3% luego de 72h de exposición al extracto (200 µg/mL). La carcinogénesis en el colon de ratones Balb/c fue inducida mediante dos inyecciones intraperitoneales de azoximetano (AOM) a la tercera y cuarta semana de haber iniciado el suministro de mango en el líquido de bebida (0,3%, 0,6%, 1,25%). Después de 10 semanas de tratamiento se observó inhibición dosis-dependiente de la formación de focos de criptas aberrantes (FCA); 0,3% de mango inhibió más del 60% de FCA ($p=0,05$) comparado con los controles que recibieron agua. Estos resultados muestran que la pulpa del mango de azúcar, un alimento natural, no tóxico, que forma parte de la dieta del ser humano contiene compuestos bioactivos capaces de reducir el crecimiento de células tumorales y prevenir la aparición de las lesiones precancerosas en colon durante el inicio de la carcinogénesis.

Palabras claves: *Mangifera indica*, fitoquímicos, cáncer de colon, quimioprevención.

SUMMARY. *In vitro* and *in vivo* effects of mango pulp (*Mangifera indica* cv. Azúcar) in colon carcinogenesis.

Mango pulp contains ascorbic acid, carotenoids, polyphenols, terpenoids and fiber which are healthy and could protect against colon cancer. The aim of this study was to evaluate the antiproliferative and preventive capacity of an aqueous extract of *Mangifera indica* cv. Azúcar on a human colon adenocarcinoma cell line (SW480) and in a rodent model of colorectal cancer, respectively. The content of total phenolics, flavonoids and carotenoids were also analyzed in the extract. SW480 cell growth was inhibited in a dose and time dependent manner by 22.3% after a 72h exposure to the extract (200 µg/ mL). Colon carcinogenesis was initiated in Balb/c mice by two intra-peritoneal injections of azoxymethane (AOM) at the third and fourth week of giving mango in drinking water (0.3%, 0.6%, 1.25%). After 10 weeks of treatment, in the colon of mice receiving 0.3% mango, aberrant crypt foci formation was inhibited more than 60% ($p=0,05$) and the inhibition was dose-dependent when compared with controls receiving water. These results show that mango pulp, a natural food, non toxic, part of human being diet, contains bioactive compounds able to reduce growth of tumor cells and to prevent the appearance of precancerous lesions in colon during carcinogenesis initiation.

Key words: *Mangifera indica*, phytochemicals, colon cancer, chemoprevention

INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon (CCO) es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo, responsable del 8% de las defunciones (~600.000), y el segundo y tercer tipo de cáncer más común en mujeres y hombres (1). A pesar de este panorama epidemiológico, hay largo período de transición, (más de dos décadas), entre el inicio de la carcinogénesis en el colon y el desarrollo del tumor maligno, bien indicado para el desarrollo y la implementación de estrategias de quimioprevención, cuyo

objetivo es el uso de agentes capaces de revertir, suprimir o prevenir la fase inicial o la progresión de las células premalignas a la enfermedad invasiva (2).

La carga de la enfermedad se distribuye diferencialmente según la región geográfica. Las mayores tasas de incidencia se registran en América del Norte, Australia/Nueva Zelanda, Europa Occidental y Japón; seguidos por la zona meridional de América del Sur con riesgo intermedio; y África y Asia con el menor número de casos. Sin embargo, la tasa de incidencia de esta enfermedad aumenta rápidamente

en los países donde el riesgo antes era bajo, lo que sugiere que los factores ambientales (hábitos dietarios y estilo de vida) constituyen un importante componente de riesgo (1, 3).

Diferentes niveles de evidencia indican que el cambio hacia una dieta saludable contribuiría a prevenir más del 30% de los casos de CCO (3). Por lo tanto, la alimentación es uno de los factores en los cuales es posible actuar para incrementar la prevención primaria. La asociación inversa entre la prevalencia del CCO y el consumo de productos de origen vegetal, esencialmente frutas, verduras, cereales integrales y leguminosas (3) se explica, en parte, gracias a su riqueza en fitoquímicos y micronutrientes capaces de inhibir el proceso carcinogénico previniéndolo, controlándolo o retardándolo mediante mecanismos antioxidantes o biológicos que modulan vías de señalización en el ciclo celular, el crecimiento celular, la apoptosis, la angiogénesis y la respuesta inmune (4-5).

En la búsqueda de agentes quimiopreventivos derivados de plantas se han identificado y se han evaluado compuestos fenólicos y flavonoides como el resveratrol, presente en las uvas, y la curcumina proveniente del tubérculo de la cúrcuma; así como también micronutrientes (vitaminas A, C, E, selenio, calcio) que han mostrado actividades antitumorales importantes tanto en sistemas *in vitro* e *in vivo* (4, 6-7).

El mango (*Mangifera indica L.*), es un fruto considerado alimento funcional por el alto contenido de compuestos bioactivos como ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles, terpenoides, y fibra (8); aunque pueden variar en cantidad de acuerdo al genotipo, parte del fruto, estado de madurez y prácticas agrícolas. La presencia de estos compuestos en el mango lo postula como un alimento con potencial quimiopreventivo. Aunque estudios de fitoquímicos individuales del mango muestran actividad anticancerígena (9-10), se ha postulado que los compuestos aislados pueden no presentar la misma actividad del alimento completo lo que sugiere que hay una relación sinérgica entre los componentes que favorezca su actividad biológica (5, 11).

La buena aceptación del mango entre los consumidores se evidencia en que es la fruta tropical más producida a nivel mundial (12), lo que sumado a su riqueza en fitoquímicos con actividad biológica y a la oportunidad de prevenir el CCO con modificaciones en la dieta, justifican este estudio en el que se evaluó la capacidad antiproliferativa en células de adenocar-

cinoma de colon y preventiva en un modelo *in vivo* de CCO de un extracto acuoso de *Mangifera indica cv. Azúcar*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las frutas utilizadas pertenecen a la variedad mango de azúcar proveniente de la costa Caribe colombiana. Se seleccionaron las frutas maduras por inspección visual según la norma técnica colombiana NTC 5139 (13); estas se lavaron, desinfectaron (hipoclorito de sodio 100 ppm) y despulparon para ser congeladas y posteriormente deshidratadas por liofilización. Se evaluó su calidad microbiológica mediante conteo total de bacterias Mesofilicas aerobias, hongos y levaduras, cuenta de Coliformes totales y fecales, *Escherichia coli* según NTC 4458 de 1998 (14); y *Salmonella sp.*, para evaluar *Salmonella* según NTC 4574 (15); y no se obtuvo crecimiento microbiano en el producto final. Para los ensayos *in vitro* se prepararon soluciones madre en dimetilsulfóxido (DMSO) con una concentración final de 0,1%, las cuales fueron sonicadas durante 30min y se tomó el sobrenadante para almacenarlo a -20 °C hasta su uso; mientras que para los ensayos *in vivo*, se preparó diariamente el extracto en agua como líquido de bebida de los animales.

Determinación de fenoles totales

Se usó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, el cual mide la reducción de este reactivo, inducida por el poder reductor de los compuestos fenólicos, con la consecuente formación de un complejo azul que se lee a 760 nm (16). Se construyó una curva patrón usando como estándar ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/100 g de pulpa seca (GAE).

Determinación de flavonoides

Se midieron por colorimetría con cloruro de aluminio y nitrato de aluminio. La absorbancia se leyó a 517 nm y el contenido de flavonoides se expresó como mg catequina/100g liofilizado (17).

Determinación de carotenoides

Se aplicó el método descrito por Biswas et al. En breve, la muestra se mezcló con acetona fría por 15 min a 4°C. El precipitado se re-extrajo repitiéndose todo el proceso anterior. Ambos extractos se mezclaron, se filtraron y se determinó la absorbancia a 449nm. La concentración de carotenoides se deter-

mino por curva de calibración utilizando β -Caroteno como sustancia patrón. Los resultados se expresaron como mg β -Caroteno/100g liofilizado (18).

Cultivo celular

Las células SW480 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC, Salisbury, UK). Se cultivaron en frascos de 25 cm² en medio DMEM suplementado con 25mM de glucosa, 2mM de L-glutamina, 10% de suero de caballo inactivado, 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 1% de aminoácidos no esenciales (Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, Francia). Las incubaciones se hicieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue remplazado cada 48 h. Para todos los experimentos, el suero de caballo fue reducido a 3%, y el medio fue suplementado con 10 μ g/mL de insulina, 5 μ g/mL de transferrina y 5 ng/mL de selenio (ITS-defined medium; Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia).

Crecimiento celular

Después de 24h de adherencia, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del extracto (50, 100 o 200 μ g/mL) por 48 h y 72 h. Después del tratamiento, las células se recolectaron por tripsinización (0,5% tripsina / 2,6 mM EDTA). Para la estimación de la supervivencia, las células fueron teñidas con azul de tripano (Invitrogen Corp.) y por microscopía óptica se contaron las células teñidas y las que no retuvieron el colorante.

Animales y tratamientos

Ratones hembras de la cepa Balb/c (n=32), obtenidos de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), con 6 semanas de edad y 16-24 g de peso, fueron conservados en condiciones adecuadas según las recomendaciones nacionales (Ley 84 de 1989, Res No. 8430 de 1993) e internacionales (Consejo de las Comunidades Europeas y Canadian Council on Animal Care, 1998), a 22-25°C, 12 h luz/12 h oscuridad, con libre acceso al alimento y al agua o al extracto de fruta (ad libitum) (0,3, 0,6 o 1,25% peso/vol) durante 10 semanas, y no se observaron variaciones significativas en el peso entre los grupos durante el período experimental. A la tercera y cuarta semana, la mitad de los animales recibieron una dosis semanal de azoximetano (AOM) vía intraperitoneal (ip) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) a una concentración de 10 mg/kg de peso; mientras que la otra mitad del grupo re-

cibió inyección ip de solución salina (NaCl) fisiológica. Todos los animales fueron sacrificados 5 semanas después de la segunda inyección de AOM o NaCl.

Evaluación de focos de criptas aberrantes (FCA)

Para la evaluación de los FCA se tomaron aproximadamente 4 cm de la parte más distal del colon. Cada segmento fue lavado con solución salina fisiológica, cortado, abierto longitudinalmente y fijado con formalina tamponada al 10%. Las muestras fueron teñidas con 0,2% de azul de metileno por 5 min y lavadas con tampón Krebs-Ringer. La lectura se realizó con un objetivo de 10X para identificar la presencia, cantidad y multiplicidad de los FCA. Fueron identificadas como criptas aberrantes aquellas de mayor tamaño, con borde epitelial engrosado y un mayor espacio pericriptal (19).

Análisis estadístico

Los datos son reportados como media + error estándar (SE). Las comparaciones entre controles y grupos tratados se hicieron usando el test de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ (GraphPad Software, San Diego California, USA).

RESULTADOS

Contenido de fenoles totales, flavonoides y carotenoides

Mediciones previas (datos no mostrados) indicaron que el contenido de carotenoides es estable durante la maduración de la fruta y que el contenido de flavonoides no varía significativamente, por eso se optó por hacer todas las determinaciones de estos metabolitos en la pulpa de la fruta madura. Los resultados de fenoles totales, flavonoides y carotenoides se muestran en la tabla 1.

Efecto antiproliferativo del extracto de mango en células SW480

Las células de adenocarcinoma de colon humano SW480 fueron expuestas por 48 y 72 horas al extracto del mango de azúcar a concentraciones de 50 a 200 μ g/mL. No se observó inhibición del crecimiento

TABLA 1. Metabolitos de la pulpa del mango de azúcar

Fenoles totales (mg ác. gálico/100g)	Flavonoides (mg catequina/100g)	Carotenoides (mg β caroteno/100g)
217,62 \pm 1,35	56,15 \pm 4,36	10.67 \pm 0.19

Media \pm desviación estándar, n=4

celular en las células que no fueron expuestas al extracto (control). En la figura 1 se observa que el crecimiento de las células SW480 disminuyó en forma dosis-tiempo-dependiente. A 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el extracto indujo un 15,7% y 21,6% de inhibición después de 72 h respectivamente. A 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la inhibición del crecimiento de SW480 alcanzó 22,3% a 72 h, pero este efecto no se observó bajo las mismas condiciones después de 48 h de tratamiento y en ambas condiciones (48 h y 72 h) no fue estadísticamente significativo.

Efecto del extracto de mango en la formación de criptas aberrantes en colon de ratón

Se indujo la carcinogénesis en el colon mediante dos inyecciones ip (una semanal) del carcinógeno químico AOM a la cuarta y quinta semana del suministro

del extracto de mango disuelto en agua como líquido de bebida (*ad libitum*) (Figura 2). En la tabla 2 se presenta el número de FCA y el análisis de multiplicidad de criptas luego de diez semanas de suministrar el extracto a los animales con o sin AOM. El colon de los animales inyectados con NaCl no presentó lesiones preneoplásicas en contraste con el grupo de ratones inyectados con AOM en el cual todos exhibieron lesiones preneoplásicas. Se encontró que el extracto de mango disminuyó de manera dosis-dependiente la formación de FCA. En los animales que recibieron extracto de mango al 0,3% se inhibió en más del 60% el número de FCA comparados con el grupo control con AOM ($p=0,05$). Además, el análisis de multiplicidad de criptas por foco indica que el extracto del mango también puede inhibir la hiperproliferación de criptas aberrantes.

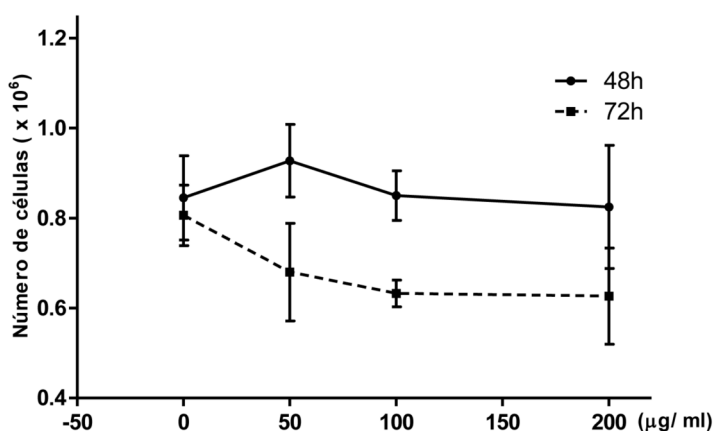


FIGURA 1. Efecto del extracto de pulpa de mango en la proliferación celular de SW480. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del extracto por 48 h y 72 h. Datos expresados como media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes.

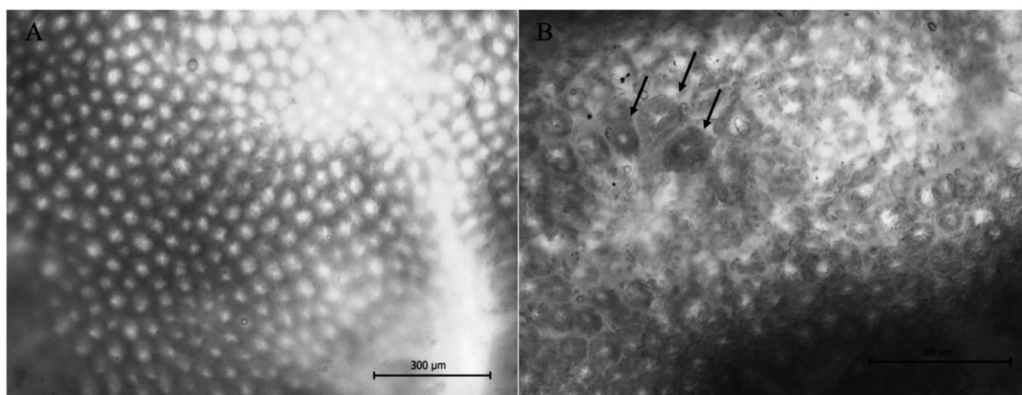


FIGURA 2. Imagen representativa de la superficie de la mucosa del colon distal de ratones inyectados con NaCl (control, A) o con azoximetano (AOM, B) después de la tinción con azul de metileno. Las flechas indican la localización de FCA.

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como fin estudiar por primera vez el extracto acuoso completo (no fraccionado) del fruto *Mangifera indica cv.* Azúcar en cuanto al contenido de fitoquímicos y su efecto en el crecimiento de células de adenocarcinoma de colon (tumor primario) SW480 y en la formación de FCA al inicio del proceso carcinogénico inducido en el colon de ratones Balb/c con el agente químico AOM.

El contenido de fitoquímicos en frutas y verduras se ha correlacionado con efectos protectores para la salud. La porción comestible

del mango contiene carotenoides y polifenoles (ácido gálico, taninos hidrolizables, quercetina y mangiferina) que pueden proteger contra el desarrollo de CCO; pero su contenido es variable. Las proporciones de estos componentes cambian de acuerdo con la variedad,

TABLA 2. Efecto del extracto de mango en la formación y multiplicidad de focos de criptas aberrantes (FCA) en el colon distal de ratones inyectados con NaCl (control), con azoximetano (AOM) y ratones inyectados con AOM que recibieron jugo de mango (JM). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar del número de FCA y del número de focos que contienen una (1C), dos (2C), tres (3C) y cuatro o más (4C+) criptas aberrantes hiperproliferativas.

Grupo	Tratamiento	# FCA/colon	% inhibición	Multiplicidad de criptas/FCA			
				1C	2C	3C	4C+
1	Control	0	-	0	0	0	0
2	AOM	24 \pm 5	-	14 \pm 3	5 \pm 2	2 \pm 1	4 \pm 1
3	0,3% JM + AOM	8 \pm 3*	66.6%	6 \pm 3	3	1	4
4	0,6% JM + AOM	3 \pm 2	87.5%	3	2	1	1
5	1,25% JM + AOM	0	-	0	0	0	0
6	1,25% JM	0	-	0	0	0	0

*, $P < 0,05$ vs grupo 2, U-Mann Whitney

edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, sistema de riego, entre otros que afectan o modifican la actividad metabólica o expresión de genes involucrados en las vías de síntesis de estos metabolitos secundarios (20-21). En Colombia, además de las variedades comerciales más conocidas (Tommy Atkins, Kent, Van Dyke, Keitt, entre otras), se reportan algunos materiales que pertenecen al grupo de las variedades criollas. Cartagena y Vega (1992) plantean la importancia de los mangos criollos, los cuales se han destacado por su agradable sabor, pero a pesar de su amplia aceptación e importancia en el mercado de las frutas (22), es poco el conocimiento acerca del contenido de compuestos bioactivos.

En este trabajo, inicialmente se analizó el contenido de fenoles totales, flavonoides y carotenoides en *Mangifera indica* cv. Azúcar. En cuanto al contenido de fenoles totales, este es alto considerando que la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) en el 2008 reportó un contenido entre 50 y 200 mg GAE/100g en variedades criollas cultivadas en todo el territorio colombiano (23), la misma apreciación se puede hacer al compararlo con los resultados que reportan otros autores (8 - > 200 mg GAE/100g), pero es similar al de la variedad Ubá cultivada en Brasil (> 200 mg GAE/100g) (9, 20, 24). En cuanto al contenido de flavonoides, su comparación con otros estudios no fue posible debido a que se han utilizado diferentes unidades para reportarlo. El contenido de carotenoides está por encima de los resultados de CORPOICA (2008) (1-4 mg/ 100g) en variedades criollas (23), y del de otras variedades de comercialización mundial como Tommy Atkins y

Haden (> 2 mg / 100g) (20), pero menor que el contenido en las variedades Kent y Keitt (> 20 mg / 100g) (25). Estos resultados indican que la variedad mango de Azúcar es una fuente importante de compuestos bioactivos, con una riqueza superior a la descrita en otras variedades.

Cada fruta representa una combinación cuantitativa y cualitativa única de fitoquímicos que interactúan entre sí y que determinará las actividades biológicas del alimento, de ahí la importancia de evaluar el efecto de la fruta completa (5). Con el fin de conocer si el mango (cv. Azúcar) tiene la capacidad para actuar como un agente bloqueador antes de la iniciación de la carcinogénesis o como un agente supresor durante la progresión de la enfermedad, se estudiaron dos modelos bien establecidos para ensayos con alimentos con potencial quimiopreventivo de CCO (19).

Los cultivos celulares han sido una herramienta útil para estudiar los efectos y mecanismos de los fitoquímicos en cáncer. La línea SW480 de adenocarcinoma de colon ha sido validada como un modelo in vitro de la progresión de CCO y se han obtenido resultados en otros estudios acerca de la actividad anticancerígena de fitoquímicos de frutas (26). En este estudio, luego de 72 h de exposición con el extracto, el número de células fue menor que a las 48 h bajo las mismas concentraciones, y se observó una inhibición dosis dependiente como previamente reportó Noratto et al. (9). Sin embargo, la mayor inhibición fue de 22,3% a una concentración de 200 μ g/mL, y según los criterios del Instituto Nacional de Cáncer de los EUA, un extracto es considerado activo si tiene la capacidad de inhibir el 50% del crecimiento de células cancerosas con una

concentración menor o igual a 30 µg/mL, pero si es mayor a 100 µg/mL es baja (27). Por lo tanto, en este trabajo, la actividad antiproliferativa del extracto de mango contra células SW480, se puede considerar baja, por lo que podría no ser efectivo en la inhibición de la fase de progresión del CCO.

El desarrollo de estrategias de quimiopreención se ha facilitado con el uso del modelo en roedores de carcinogénesis en colon inducido con AOM. Este modelo recapitula los principales eventos clínicos, patológicos y moleculares que ocurren en el CCO esporádico en el humano, incluyendo la formación de FCA (19). En el ensayo *in vivo* se probaron concentraciones del mango de azúcar equivalentes al tamaño de una porción o menos de lo que sugiere el sistema de intercambio de alimentos y la encuesta de situación nutricional (2005), lo que permite concluir que la ingestión de por lo menos 27 g de mango, podría contribuir a disminuir la probabilidad de CCO, pero solo si hace parte de una dieta y hábitos de vida saludables como ha sido recomendado por los expertos (28).

Los resultados en el modelo *in vivo* sugieren que el mango tiene propiedades para inhibir el inicio de la carcinogénesis en el colon, posiblemente atribuible a los compuestos bioactivos presentes como polifenoles y carotenoides. Varios autores coinciden en que el ácido gálico es uno de los principales polifenoles contenidos en la pulpa de mango, seguido por taninos hidrolizables, quercetina y mangiferina (29); y en cuanto a los carotenoides, la violaxantina y el β-caroteno se han identificado como los más abundantes (30). Muchos investigadores han propuesto la mangiferina como el principio activo de los extractos de mango; por su capacidad antioxidante, su potencial como agente quimiopreventivo y otras actividades biológicas demostradas (10), pero es necesario el sinergismo entre los fitoquímicos presentes en la fruta para potenciar la actividad biológica de cada uno (29).

De todos estos fitoquímicos se ha descrito que son potentes antioxidantes, lo que podría beneficiar a la célula aumentando los mecanismos de defensa en el colon para evitar el daño oxidativo que puede generar el proceso carcinogénico desencadenado por el AOM; así como se observó en el hígado de ratas que consumieron la fruta y desarrollaron menos cambios citotóxicos generados por el tratamiento con dimetilhidrazina, un carcinógeno precursor del AOM, optimizando los mecanismos enzimáticos antioxidantes (31).

La quercetina contiene en su estructura un doble enlace en el anillo C y el grupo 4-oxo, los cuales son determinantes estructurales que potencian su acción como antioxidante (32). Estudios han mostrado la inhibición de proteínas-quinasas, ADN topoisomerasas y regulación de la expresión génica modulando la transactivación de receptores nucleares (8, 29). Los ácidos fenólicos por su parte, son considerados donantes de hidrógeno eficientes por tener en su estructura el grupo carboxílico que es fácilmente ionizado, y tienen grupos hidroxílicos adicionales también disponibles para la donación de átomos de hidrógeno como el ácido gálico que contiene tres grupos hidroxílicos, lo que podría explicar su alta contribución al poder antioxidante del mango (*cv.* Ataulfo) (32-33). La presencia de dobles enlaces conjugados en la estructura de los carotenoides es la responsable de que puedan actuar como neutralizadores de radicales libres y de otras especies reactivas de oxígeno (34), y algunos como el β-caroteno, luteína y licopeno se mantienen disponibles en el tracto gastrointestinal durante todo el proceso de digestión (35). Además de los anteriores, el mango también es fuente importante de vitamina C la cual puede actuar en conjunto con otros antioxidantes para protegerlos de la degradación oxidativa lo que resulta en un efecto biológico más prolongado de polifenoles como la quercetina (32).

Los resultados de este trabajo y antecedentes de él, sugieren que la capacidad antioxidante de esta fruta es relevante en la iniciación de la carcinogénesis cuando las especies reactivas del oxígeno y otros carcinógenos pro-oxidantes generan mutaciones en el ADN, por lo que es en esta etapa donde la capacidad antioxidante de los fitoquímicos puede tener un efecto relevante en la actividad anticancerígena de la fruta, y no en la progresión donde se precisan de mecanismos adicionales.

CONCLUSIÓN

Este es el primer estudio que resalta las propiedades anticarcinogénicas de *Mangifera indica cv.* Azúcar y muestra su potencial como agente quimiopreventivo que ayuda a bloquear el inicio de la carcinogénesis en el colon; adicionalmente, nuestro grupo realiza estudios en curso para conocer la capacidad de esta fruta para prevenir la progresión de las lesiones precancerosas en pólipos adenomatosos. Estos hallazgos pueden contribuir al desarrollo de nuevos suplementos o

fitoterapéuticos a base de compuestos bioactivos de esta fruta dirigidos a individuos con lesiones premalignas o para prevenir su recurrencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia, código 624/convocatoria de mediana cuantía 2011. Agradecemos al bioterio de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), al laboratorio de Alimentos Funcionales de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y a COLCIENCIAS por la beca otorgada a la estudiante de doctorado.

REFERENCIAS

1. GLOBOCAN. Colorectal Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008. 2008 [cited 2013 Septiembre 20]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
2. Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*, 1976. 36(7 PT 2): p. 2699-702.
3. World Cancer Research Fund/American Institute of Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer 2011 Report. 2011, AICR: Washington DC.
4. Shu L, Cheung KL, Khor T, Chen C, Kong AN. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. 29(3): p. 483-502.
5. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr*, 2004. 134(12 Suppl): p. 3479S-3485S.
6. Xu X, Yu E, Liu L, Zhang W, Wei X, Gao X, et al. Dietary intake of vitamins A, C, and E and the risk of colorectal adenoma: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Prev*, 2013. 22(6): p. 529-39.
7. Peters U, Takata Y. Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*, 2008. 52(11): p. 1261-72.
8. Ribeiro S, Schieber A. Bioactive Compounds in Mango (*Mangifera indica* L.), in *Bioactive Foods in Promoting Health*, P.V. Watson R, Editor. 2010, Academic Press: California. p. 507-23.
9. Noratto GD, Bertoldi MC, Krenek K, Talcott ST, Stringheta PC, Mertens-Talcott SU. Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(7): p. 4104-12.
10. Yoshimi N, Matsunaga K, Katayama M, Yamada Y, Kuno T, Qiao Z, et al. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Lett*, 2001. 163(2): p. 163-70.
11. Percival SS, Talcott ST, Chin ST, Mallak AC, Lounds-Singleton A, Pettit-Moore J. Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells and cell cycle of HL-60 cells are inhibited by mango (*Mangifera indica* L.) juice and mango juice extracts. *J Nutr*, 2006. 136(5): p. 1300-4.
12. Manjavacas M. La producción mundial de fruta tropical alcanzará 82 millones de toneladas en 2014. *ValenciaFruits.com* 2012; Available from: <http://www.valenciafruits.com/agrocultivos/general/1152-la-produccion-mundial-de-fruta-tropical-alcanzara-82-millones-de-toneladas-en-2014>.
13. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Norma técnica Colombiana 5139. Frutas frescas. Mangos criollos. Especificaciones. 2004, ICONTEC: Bogotá DC.
14. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Norma técnica Colombiana 4458. Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénico. 2007, ICONTEC: Bogotá DC.
15. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Norma técnica Colombiana 4574. Microbiología de alimentos y alimentos para animales método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. 2007, ICONTEC: Bogotá DC.
16. Naranjo M, Vélez T, Rojano B. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Rev Cubana Plant Med*, 2011. 16(2): p. 164-73.
17. Debnath T, Park P-J, Debnath NC, Samad NB, Park HW, Lim BO. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. *Food Chemistry* 2011. 128(697-703).
18. Biswas AK, Sahoo J, Chatli MK. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *Food Science and Technology*, 44, 1809 – 1813, 2011. 44: p. 1809-13.
19. Bousserouel S, Lamy V, Gosse F, Lobstein A, Marescaux J, Raul F. Early modulation of gene expression used as a biomarker for chemoprevention in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Pathol Int*, 2011. 61(2): p. 80-7.
20. Ribeiro SMR, De Queiroz JH, Lopes ME, Campos FM, Pinheiro M. Antioxidant in Mango (*Mangifera in-*

- dicaL.) Pulp. Plant Foods for Human Nutrition, 2007. 62: p. 13-17.
21. Ribeiro SMR, Barbosa LCA, Queiroz JH, Knodler M, Schieber A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. Food Chemistry, 2008. 110: p. 620-26.
 22. García J, Floriano JA, Corredor JP, Bernal JA, Vásquez LA, Sandoval AP, et al. Descripción de las variedades de mango criollo colombiano, CORPOICA, Editor. 2010, Produmedios: Colombia. p. 72.
 23. García J, Floriano JA, Corredor JP, Bernal JA, Vásquez LA, Sandoval AP, et al. Atributos de calidad del mango criollo para la agroindustria, CORPOICA, Editor. 2010, Produmedios: Colombia. p. 72.
 24. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. Food Chemistry, 2008. 111: p. 816-23.
 25. Gonzalez-Aguilar GA, Celis J, Sotelo-Mundo RR, de la Rosa LA, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Physiological and biochemical changes of different fresh-cut mango cultivars stored at 5 °C. Food Sci Technol Int. , 2008. 43: p. 91-101.
 26. Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R, Martin P, Tsokos M, et al. Validation of a model of colon cancer progression. J Pathol, 2000. 192(4): p. 446-54.
 27. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery, in Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity, H. K, Editor. 1990, Academic Press: London. p. 71-133.
 28. Perera PS, Thompson RL, Wiseman MJ. Recent Evidence for Colorectal Cancer Prevention Through Healthy Food, Nutrition, and Physical Activity: Implications for Recommendations. Curr Nutr Rep, 2012. 1: p. 44-54.
 29. Masibo M, He Q. Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. CRFSFS, 2008. 7: p. 309-19.
 30. Ornelas-Paz JJ, Yahia EM, Gardea AA, Failla ML. Carotenoid Composition in 'Ataulfo' Mango and Their Bioavailability and Bioconversion to Vitamin A. Acta Hort. , 2010. 2(877): p. 1245-52.
 31. Anilakumar KR, Khanum F, Krishna KRS, Santhanam K. Reduction of dimethylhydrazine-induced cytotoxicity by mango fruit bar: Changes in antioxidant enzymes in rats. Plant Foods for Human Nutrition, 2003. 58: p. 1-11.
 32. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga J. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med., 1996. 20(7): p. 933-56.
 33. Palafox-Carlos H, Yahia EM, González-Aguilar GA. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. Food Chemistry, 2012. 135: p. 105-11.
 34. Robles-Sánchez M, Gorinstein S, Martín-Belloso O, Astiazarán-García H, González-Aguilar G, Cruz-Valenzuela R. Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. Interciencia, 2007. 32(4): p. 227-32.
 35. Vitale AA, Bernatene EA, Pomilio AB. Carotenoides en quimiopreención: Licopeno. Acta Bioquím Clín Latinoam, 2010. 44(2): p. 195-238.

Recibido: 23-01-2014

Aceptado: 28-04-2014

Biomarcadores óseos y su relación con la densidad mineral ósea en adultas jóvenes y adolescentes en su primer año posparto

Reyna Sámano, Hugo Martínez-Rojano, Ana Lilia Rodríguez-Ventura, Estela Godínez-Martínez, Maricruz Tolentino, Gabriela López-de-Cárdenas, Fernando Isoard, Soledad de Santiago.

Instituto Nacional de Perinatología. Instituto Politécnico Nacional. Universidad del Altiplano de Tlaxcala. Universidad Iberoamericana Ciudad de México. Universidad del Valle de México. México

RESUMEN. La información sobre biomarcadores óseos en adolescentes y adultas durante el periodo posparto es incierta, por lo que el objetivo de este artículo fue analizar el patrón de biomarcadores óseos en adolescentes y adultas a 15, 90, 180 y 365 días posparto (dpp) y su asociación con la densidad mineral ósea (DMO) y lactancia materna. Se realizó un estudio de cohorte en 32 madres adolescentes ≤ 17 años y 41 adultas de 18 a 29 años de edad en el primer año posparto. Se realizaron medidas antropométricas, DMO y biomarcadores óseos y así como datos del tipo y la duración de lactancia. Como resultados se encontró asociación entre la concentración basal de N-telopéptidos ≤ 24 $\mu\text{g/L}$ y mayor aumento de DMO. Las adolescentes tuvieron mayor concentración de N-telopéptidos ($p \leq 0.004$) y menor concentración de osteocalcina (5 ± 3 vs 13 ± 4 , $p < 0.001$) que las adultas. La lactancia no afectó el cambio de DMO ($p > 0.050$), ni de biomarcadores óseos. La osteocalcina se asoció con el cambio en DMO ($p < 0.040$). La prolactina fue mayor entre las que practicaron lactancia materna exclusiva ($p < 0.001$). A menor edad menores concentraciones de osteocalcina ($p < 0.001$) y mayores concentraciones de N-telopéptidos ($p < 0.001$). Se concluyó que a menor concentración de N-telopéptidos y mayor de osteocalcina hubo un mayor aumento de DMO, lo cual implica menor aumento de ésta en el grupo de adolescentes. La lactancia no afectó la DMO.

Palabras clave: Adolescente, densidad mineral ósea, N-telopéptidos, osteocalcina, posparto, México.

SUMMARY. Bone biomarkers and its relation with bone mineral density in adults and adolescents during the first year postpartum. The objective of this study was to describe the trend of bone biomarkers in adults and adolescents women at 15, 90, 180 and 365 postpartum days (ppd) and its relation with bone mineral density (BMD). It was a prospective cohort of 32 teenager's ≤ 17 and 41 women from 18 to 29 years old. We evaluated diet, anthropometry, BMD, bone biomarkers and hormonal profile. In all, the concentration of N-telopeptide was higher at 15 days postpartum decreasing during first year postpartum, but adolescents had the highest concentration. The lowest N-telopeptide concentration was associated with highest increasing of the BMD. Osteocalcin concentration was lower in adolescents than in adults women (5 ± 3 vs 13 ± 4 ng/mL, $p < 0.001$) during first year postpartum. Exclusive breastfeeding did not affect the BMD ($p > 0.050$) or bone biomarkers. Osteocalcin concentration was positively associated with bone BMD ($p < 0.040$), breastfeeding did not affect osteocalcin concentrations. Prolactin was higher among women who breastfed exclusively ($p < 0.001$). Age and breastfeeding inversely correlated with bone biomarkers ($p < 0.001$) N-telopeptide and PTHi respectively. We concluded that a lower N-telopeptide concentration and a higher osteocalcin concentration were associated with a higher increasing of BMD, so then, adolescents showed the lowest recovery of the BMD. Breastfeeding does not affect the BMD.

Key words: Adolescent, bone density, N-telopeptide, osteocalcin, postpartum Mexico.

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo constituye el principal sostén del cuerpo y es la mayor reserva de calcio. Durante la adolescencia se acumula casi 50% de la masa ósea total (1,2). Se ha observado que a lo largo de la gestación y la lactancia hay un mayor recambio de la masa ósea (3), proceso por el cual el hueso viejo es

reemplazado por hueso nuevo en un mismo sitio y es el responsable de la completa regeneración del sistema esquelético del adulto (4). Sin embargo, el proceso de resorción ósea es más rápido que el de formación, por lo que todo aumento en el ciclo de remodelamiento conlleva a una pérdida de la masa ósea (5).

En la remodelación ósea intervienen biomarcadores como los N-telopéptidos, los cuales se han asociado a

la degradación de la matriz ósea, son sensibles y específicos de la resorción ósea (6). Por otra parte, la osteocalcina producida por los osteoblastos en concentraciones elevadas correlaciona con la formación o remodelado óseo (7). Las hormonas estradiol y progesterona también participan en la resorción y formación ósea respectivamente (8). El calcio participa en la remodelación y formación ósea, manteniéndose en condiciones óptimas cuando su aporte dietario es adecuado acorde a las necesidades fisiológicas de los sujetos, pero cuando la concentración sérica o iónica de calcio baja, la secreción de la hormona paratiroidea (PTH por sus siglas en inglés) aumenta, lo que resulta en un mayor recambio óseo (9-12). El bajo consumo de calcio en mujeres mexicanas (13,14) se puede relacionar con la desmineralización ósea (10).

Previamente se documentó que la densidad mineral ósea (DMO) de la vértebra lumbar 2 a la 4 (L2-L4) y del cuello del fémur no disminuye en mujeres adolescentes durante el periodo posparto y que la edad y las concentraciones de estradiol podrían estar relacionadas con estos resultados (14), sin embargo el patrón hormonal que influye sobre el recambio óseo en adolescentes y adultas que practican la lactancia materna es incierto en esta población, por ello es necesario comprobar los postulados que establecen que en la edad materna, las hormonas y la lactancia humana pueden influir en la pérdida o recuperación de la DMO (11-12).

El propósito de esta investigación fue analizar el patrón de biomarcadores óseos en madres adolescentes y adultas a los 15, 90, 180 y 365 días posparto (dpp) y su asociación con la DMO y la lactancia materna.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación deriva de una cohorte de madres adolescentes y adultas atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) en México, de los años 2003 a 2010 y esta parte del estudio comprende el análisis de biomarcadores de formación y resorción ósea y su asociación con la DMO y la lactancia materna durante el primer año posparto, en un análisis secundario se describió la evolución de la DMO (14). La cohorte, consistió de una muestra de 73 mujeres en el periodo posparto; seguidas por 1 año posterior al parto, de las cuales 32 eran ≤ 17 años de edad y 41 mujeres de 18 a 29 años. El tamaño muestral se calculó con base en la diferencia del 7% en la pérdida de DMO, un valor de

alfa de 0.05 y de beta de 0.20. Cabe destacar que durante la adolescencia se adquiere el 50% de la masa ósea, las mujeres en esta etapa son consideradas vulnerables fisiológicamente, aunado al proceso de gestación en el que las demandas de nutrimentos se incrementan por la formación del nuevo ser, incrementando el riesgo de osteopenia a edades tempranas por una débil adquisición de la masa ósea, potenciado por un consumo deficiente de calcio y otros nutrimentos relacionados con la masa ósea, por ello es que se contó con casos de adolescentes y los controles con adultas jóvenes, bajo las mismas condiciones socioeconómicas y geográficas (14). Los criterios de selección fueron los siguientes: sin evidencia de enfermedades metabólicas o infecciosas, primigestas, con producto único vivo a término y eutrófico, con método anticonceptivo el ritmo, el dispositivo intrauterino o el preservativo durante el periodo de seguimiento. No se incluyeron las que tuvieron antecedentes personales de alguna enfermedad ósea, crónica y/o aguda, presencia de toxicomanías y/o que no aceptaron participar en la investigación. Todas las participantes firmaron carta de consentimiento informado, se solicitó la autorización y firma de sus padres o tutores en el caso de las adolescentes. El estudio aprobado por los Comités de Ética e Investigación del propio Instituto.

Las participantes se citaron para su primera evaluación a las dos semanas después del parto, todas las valoraciones, excepto la densitometría ósea; se realizaron a los 15, 90, 180 y 365 días posteriores al parto.

Cuarenta y siete mujeres menores o igual a 17 años y 58 adultas jóvenes (18 a 29 años) iniciaron el estudio, sin embargo, se presentó una tasa de deserción cercana al 25% en ambos grupos.

Densidad mineral ósea

La evaluación de la DMO se efectuó mediante absorciometría dual de rayos X (DEXA) con un densitómetro óseo de la serie Lunar Prodigy (GE Healthcare, Bélgica) y los sitios de evaluación fueron en la columna vertebral L2 - L4, cuello y trocánter de fémur y el triángulo de Wards a los 15, 90 y 365 dpp.

Lactancia materna

En cada una de las citas de evaluación a las madres se interrogó sobre el número de tetadas (mamadas) y biberones que fueron proporcionados al lactante. La clasificación de lactancia materna exclusiva fue acorde con el número de tetadas y biberones-onzas con fórmula maternizada que se administraban al lactante; ≥ 8

tetadas y 0 onzas de fórmula al día fue considerada como lactancia materna exclusiva, incorporar a la alimentación del infante más de cuatro onzas con fórmula maternizada fue considerada como lactancia no exclusiva, cero tetadas y alimentación con fórmula fue considerada lactancia artificial. De acuerdo con la duración en la que se proporcionó la lactancia materna exclusiva se hicieron los siguientes puntos de corte para el análisis 0 meses (lactancia artificial), 1 a 5 meses (lactancia no exclusiva), más de 6 meses con lactancia (lactancia exclusiva) (16).

Análisis bioquímico

Todas las muestras de sangre materna se tomaron en ayuno previo de 8 horas. Las determinaciones séricas de prolactina y progesterona se realizaron mediante un método automatizado usando la técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), la detección fue por quimioluminiscencia en un equipo IMMULITE-1000 (Siemens, Estados Unidos) para lo cual se utilizó un volumen aproximado de 50 μ L de suero para cada análisis; la cuantificación de osteocalcina se efectuó con la técnica de ELISA manual por el método Metroosteocalcina con un equipo Quidel, sus unidades de expresión fueron en ng/mL, en el laboratorio del Departamento de Nutrición y Bioprogramación del INPer. Para la cuantificación de las concentraciones de N-telopéptidos se utilizó la técnica de radioinmunoensayo (RIA) en un equipo contador gamma, expresadas como μ g/L. La PTHi (parathormona intacta) se determinó por la técnica de IRMA (análisis inmunoradiométrico) con un equipo contador gamma expresado en ng/L, estos análisis por el Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas, Ciudad de México.

Otros datos. Todas las participantes fueron medidas y pesadas en cada evaluación, con estas mediciones se calculó el IMC, a través de una encuesta se obtuvo la edad cronológica, edad de la menarca y con estos datos se calculó la edad ginecológica (edad cronológica – edad de la menarca), además se cuestionó cuál era el método anticonceptivo utilizado durante el último mes, así como el mes en que se reinstaló la menstruación. Los datos sociodemográficos correspondieron a mujeres que pertenecen a un nivel socioeconómico medio bajo y bajo, con una escolaridad de secundaria incompleta o menos (14).

Análisis estadístico

Se compararon las medias de los grupos con respecto al tiempo y la edad con análisis de medidas re-

petidas y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para identificar la asociación entre las variables con distribución no paramétrica. Los puntos de corte usados en la tabla 2a y 2b fueron de acuerdo con la mediana de los propios datos de la concentración de osteocalcina y N-telopéptidos, con la finalidad de tener grupos homogéneos en el análisis. Se consideró una diferencia o asociación significativa cuando existió un valor de $p < 0.05$, el análisis se efectuó mediante el programa estadístico SPSS para Windows, versión 15.

RESULTADOS

Del total de mujeres invitadas y que completaron el estudio 32 eran ≤ 17 años de edad y 41 de 18 a 29 años, cuando se compararon las medias de los casos completos y las deserciones no se presentó diferencia significativa en edad cronológica, edad ginecológica, estatura, peso pregestacional, peso máximo gestacional, índice de masa corporal (IMC), DMO en L2-L4, cuello de fémur, trocánter y triángulo de Wards. N-telopéptidos, osteocalcina, progesterona, PTHi y prolactina basales.

La edad cronológica de todas las participantes fue de 20 ± 4.4 años, con una edad de la menarca de 12.0 ± 1.4 años, edad ginecológica de 7.4 ± 4 años. Las adolescentes presentaron una edad cronológica en años de 15.6 ± 0.7 , en las adultas ésta correspondió a 22.6 ± 3.5 . El IMC al inicio del estudio fue cercano a 23 kg/m^2 en adolescentes y adultas.

El tiempo de práctica de lactancia exclusiva en adolescentes fue de 0 meses en 13 casos (40%), de 1 a 5 meses en 9 (27%) y 6 meses o más en 11 participantes (33%); mientras que las adultas que lactaron 0 meses fueron 14 (35%), de 1 a 5 meses 16 casos (40%) y seis meses y más lo practicaron 10 mujeres (25%), sin asociación significativa por edad ($p=0.500$).

En las Figuras 1a y 1b se puede observar la tendencia de la DMO por práctica de lactancia por grupo de edad, sobresalió que las adolescentes no disminuyeron su masa ósea, sin embargo, mantuvieron valores más bajos que las adultas ($p < 0.001$), no se observó diferencia significativa por práctica de lactancia ($p > 0.050$), cabe mencionar que se recuperaron las cifras basales de DMO.

Biomarcadores óseos

En la Tabla 1 se aprecia que la mayor concentración de N-telopéptidos se ubicó a los 15 dpp, mientras que la osteocalcina tuvo un patrón inverso. En cuanto

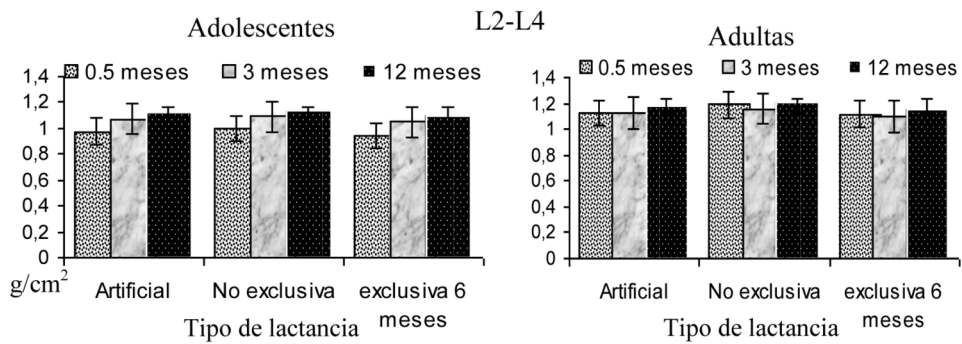


FIGURA 1A. Patrón de la DMO de L2-L4 y trocánter de fémur a 0.5, 3 y 12 meses posparto en adolescentes y adultas por práctica de lactancia.

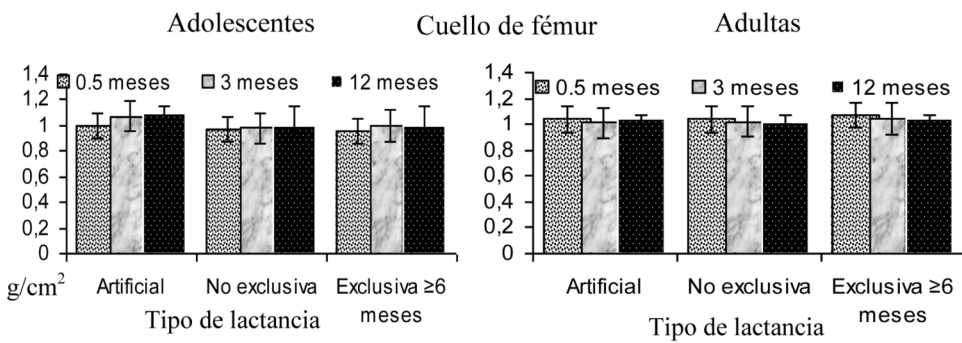
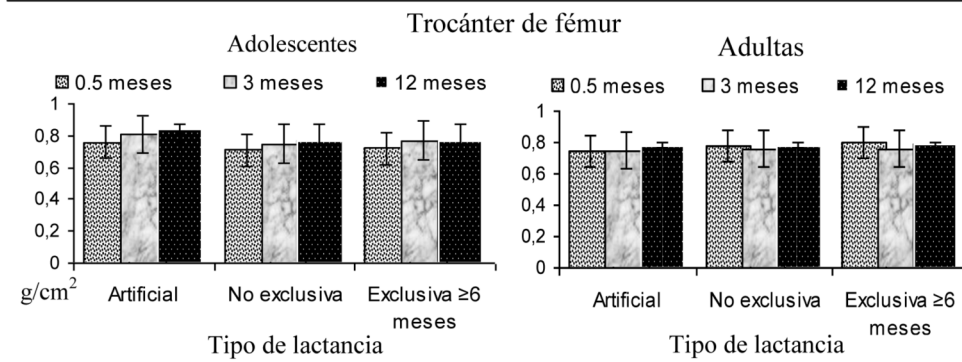
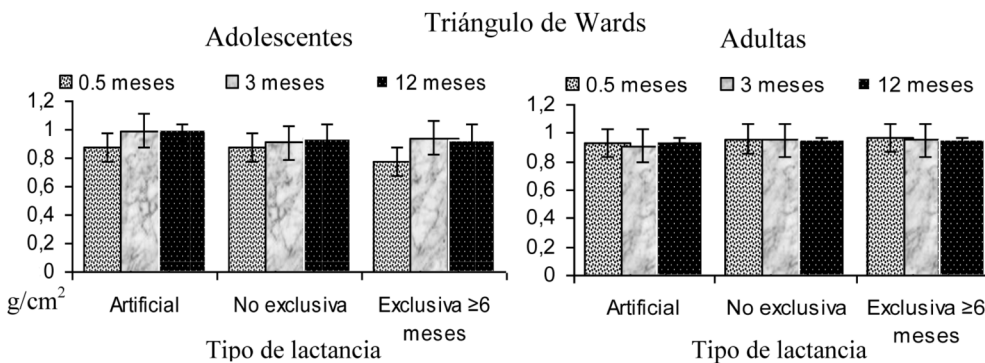


FIGURA 1B. Patrón de la DMO de cuello fémur y triángulo de Wards a 0.5, 3 y 12 meses posparto; en adolescentes y adultas por práctica de lactancia.



a los grupos de edad, las adolescentes fueron las que tuvieron las cifras más altas de N telopéptidos y menores de osteocalcina.

En la Figura 2a se observa que a mayor frecuencia de práctica de lactancia exclusiva menor era la concentración de N- telopéptidos, no obstante, con el

tiempo estas concentraciones disminuyeron. Las adolescentes tuvieron concentraciones más altas de N- telopéptidos, comparadas con las adultas. Por su parte, la osteocalcina fue menor en las adolescentes, sin efecto por práctica de lactancia ni por el tiempo. La progesterona fue más alta entre las adolescentes,

TABLA 1. Tendencia de biomarcadores óseos por grupo de edad.

Tiempo posparto en días	Grupo de edad		p
	Adolescentes n=32	Adultas n=41	
N-telopéptidos (µg/L)			
15	24,2 ±4	24,2±3	0,96
90	10,7±3	8±2	<0,001
180	8,6±2	7±1	0,004
365	7,6±3	5±2	<0,001
Osteocalcina (ng/mL)			
15	4,5±1	9,6±1	<0,001
90	5±3	11±5	<0,001
180	5±2	13±5	<0,001
365	5±3	13±4	<0,001
PTH (ng/L)			
15	17±9	15±6	0,152
90	18±7	19±6	0,598
180	21±10	20±4	0,563
365	23,4±9	23±4	0,984

Datos presentados en media ± desviación estándar. T de Student

siendo mayores los valores en proporción al tiempo posparto. En cambio, la prolactina sólo se vio afectada por la práctica de lactancia en ambos grupos. La PTHi, aumentó de forma significativa conforme avanzó el seguimiento, independientemente de la edad y práctica de lactancia materna, como se ve en la figura 2b

DMO, N-telopéptidos y osteocalcina

En las tablas 2a y 2b se muestra que el cambio de la DMO se relacionó con la concentración de los N-telopéptidos a los 15 dpp, siendo mayor el aumento de la masa ósea entre las que tenían menos N-telopéptidos. En contraste, las que tuvieron cifras ≤6 ng/mL de osteocalcina tuvieron menor aumento de DMO. La lactancia no tuvo efecto en la DMO de los sitios estudiados.

En esta investigación se observó que la edad ginecológica correlacionó directamente con osteocalcina e inversamente con la concentración de N-telopéptidos, mientras que la lactancia tuvo una correlación inversa con N-telopéptidos y PTHi, como se ve en la tabla 3.

DISCUSIÓN

Este estudio evidencia la variabilidad de los biomarcadores óseos en un mismo período fisiológico de una muestra de mujeres jóvenes mexicanas con diferente edad y práctica de lactancia así como su efecto sobre la DMO.

Las concentraciones de N-telopéptidos en todas las mujeres disminuyeron independientemente de la práctica de la lactancia materna, de esta forma se postula que la pérdida ósea posparto es fisiológica y se explica por la presencia de N-telopéptidos en el grupo de las adultas, en quienes las concentraciones de N-telopéptidos fueron semejantes a los observados en las mujeres posmenopáusicas (15), así se asume que las adultas atraviesan por un proceso de desgaste óseo aunado al hipoestrogenismo propio del periodo posparto, que va disminuyendo conforme avanza el tiempo. En la presente investigación no se evidenció el papel de la progesterona sobre la DMO, sin embargo se ha documentado que en adolescentes la progesterona se puede asociar con el aumento de la DMO en el periodo posparto, en conjunto con otros factores como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (17) y el estradiol; hormonas que desafortunadamente no fueron evaluados en este estudio. En este mismo sentido las adolescentes podrían llegar a presentar altas concentraciones de IGF-1 y estradiol contribuyendo así al crecimiento de la estatura, junto con receptores de la vitamina D (18).

Por su parte, las concentraciones de osteocalcina fueron inferiores en el grupo de adolescentes, lo que indica una baja remodelación ósea y por lo tanto una menor capacidad de remodelación. Aún así, las adolescentes de este estudio presentó concentraciones de osteocalcina menores comparadas con otros grupos de adolescentes nulíparas españolas (17, 19), lo que advierte que si bien las madres adolescentes no pierden tanta masa ósea como las adultas, sí podrían limitar su pico máximo de masa ósea, por el propio proceso reproductivo. En este mismo sentido, en las adultas la osteocalcina mostró concentraciones similares a las de mujeres posmenopáusicas (13.3 vs 13.5 ng/mL) (15), por consiguiente, el grupo de las adultas podría estar cursando por un desgaste óseo desde el primer día postparto, manifestado en la DMO y la osteocalcina a los 90 dpp, que se elevó para cubrir la resorción ósea provocada por los N-telopéptidos desde los 15 dpp.

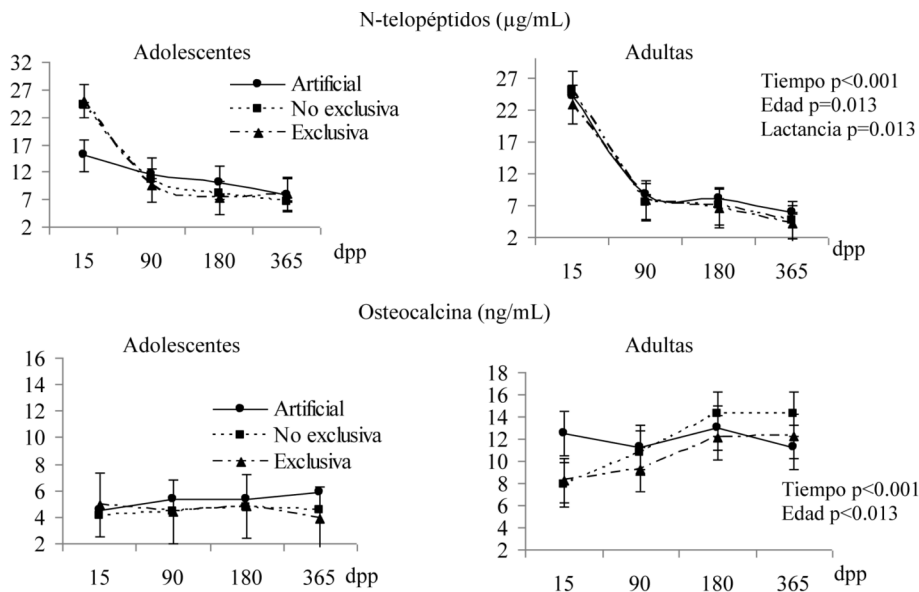


FIGURA 2A.
Patrón de N-telopéptidos y osteocalcina por práctica de lactancia y grupo de edad.
dpp: días posparto.
Análisis de datos repetidos

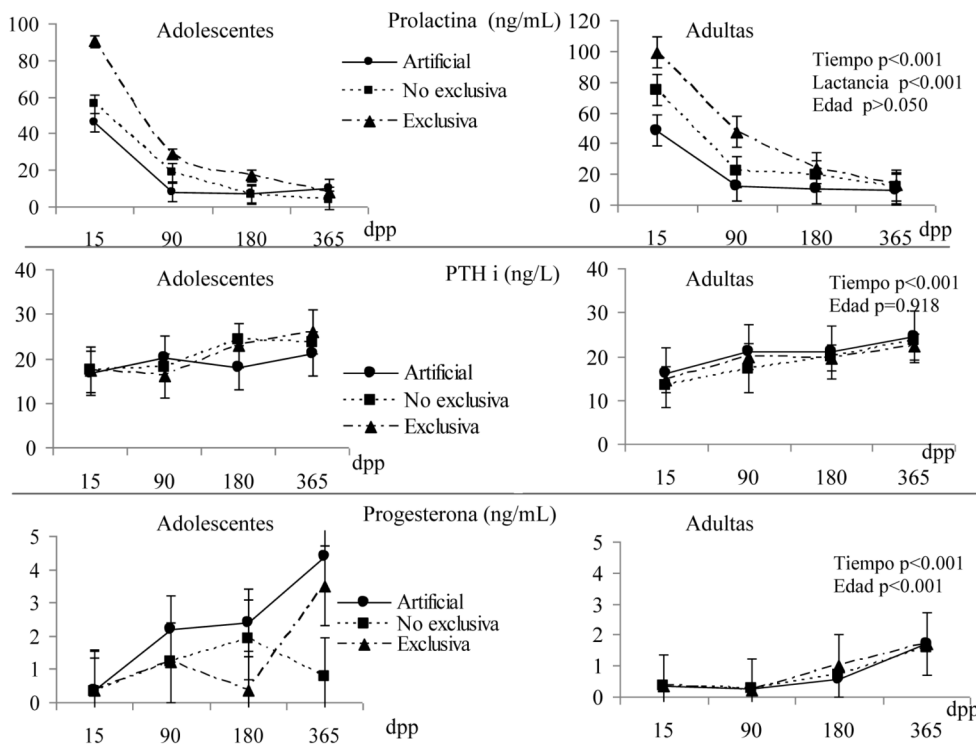


FIGURA 2B.
Patrón de prolactina, PTHi y progesterona por práctica de lactancia y grupo de edad.
Análisis de datos repetidos.
PTHi: parathormona intacta, dpp: días posparto

Las concentraciones de PTHi en todas las que participaron en este estudio fueron similares a las reportadas en madres adolescentes brasileñas a los 180 dpp con baja ingestión de calcio (18). La PTHi no mostró diferencia significativa por edad o práctica de lactancia, con relación a lo anterior, se ha reportado que durante los períodos de embarazo y lactancia la PTHi muestra

mayores concentraciones cuando la ingestión de calcio es baja, para mantener la concentración de calcio sérico a expensas de la masa ósea con la finalidad de evitar la pérdida renal de calcio (20-22) y como se ha documentado los porcentajes de adecuación de calcio en madres adolescentes son inferiores a lo reportado en población adulta y adolescente en México (13,14, 23).

TABLA 2A. DMO según concentración de N-telopéptidos a los 15 dpp y duración de la práctica de lactancia exclusiva.

N-telopéptidos µg/L	Tiempo de lactancia (en meses)					
	0		1-5		6 y más	
	≤23.8 n=12	≥24 n=11	≤23.8 n=12	≥24 n=15	≤23.8 n=14	≥24 n=9
DMO (dpp)						
L2-L4*						
15	1,035±0,1	1,066±0,1	1,107±0,2	1,146±0,2	1,040±0,1	1,007±0,2
90	1,063±0,1	1,129±0,1	1,112±0,1	1,150±0,2	1,081±0,1	1,063±0,1
360	1,099±0,1	1,202±0,1	1,193±0,1	1,184±0,2	1,135±0,1	1,112±0,1
Cuello de fémur *						
15	0,995±0,1	1,038±0,1	0,996±0,1	1,034±0,2	1,008±0,1	1,024±0,1
90	0,979±0,1	1,050±0,1	0,999±0,1	1,011±0,2	1,028±0,1	1,011±0,1
360	1,019±0,1	1,073±0,1	1,015±0,1	1,024±0,2	1,048±0,1	1,032±0,1
Triángulo de Wards*						
15	0,885±0,1	0,923±0,2	0,893±0,2	0,964±0,2	0,882±0,2	0,862±0,2
90	0,891±0,1	0,986±0,1	0,932±0,1	0,940±0,2	0,957±0,2	0,926±0,1
360	0,942±0,1	0,943±0,1	0,954±0,1	0,937±0,2	0,964±0,1	0,923±0,1
Trocánter de fémur *						
15	0,707±0,1	0,783±0,1	0,745±0,1	0,761±0,1	0,766±0,1	0,741±0,1
90	0,723±0,1	0,829±0,1	0,762±0,1	0,757±0,1	0,784±0,1	0,740±0,2
360	0,757±0,1	0,845±0,1	0,797±0,1	0,756±0,1	0,792±0,1	0,792±0,1

Datos presentados en media ± desviación estándar. Análisis de datos repetidos. DMO: densidad mineral ósea, dpp: días posparto

* Intrasujetos e intersujetos efecto tiempo $p < 0.001$, N telopéptidos y lactancia $p > 0.050$

Por su parte, la prolactina mostró una tendencia diferente por práctica de lactancia materna en ambos grupos y no se asoció con el cambio de la DMO, de esta forma se evidenció que la lactancia materna fue determinante de las concentraciones séricas.

En este documento se observó que la edad ginecológica correlacionó inversamente con la concentración de progesterona y de los N-Telopéptidos, con ello se puede deducir que la madurez fisiológica sería la principal determinante de la salud y desgaste óseo; porque los valores de biomarcadores como la osteocalcina aumentan con la edad (24) para una mayor formación ósea, sin embargo, es preciso reiterar que la muestra de adultas jóvenes fue de menores de 30 años, quienes aún están en formación de masa ósea. (25)

En esta muestra se observó que el tiempo fue la principal variable asociada al cambio en la DMO, mientras que los biomarcadores relacionados al cambio en la DMO fueron osteocalcina y N-telopéptidos, sin que la práctica de lactancia afectara los biomarcadores ni la DMO; contrario a lo reportado (26) en adul-

tas con edad cercana a los 31 años, donde se observó que a mayor tiempo de lactancia mayor concentración de osteocalcina y de telopéptido C terminal.

Los autores de este documento consideran necesario contar con más estudios que corroboren este postulado en población joven; principalmente porque en México las menores de 30 años, incluyendo adolescentes, siguen embarazándose en una tasa alta y acorde con lo hallado en este artículo, se estaría limitando su pico de masa ósea máxima. En este documento se pudo reiterar que la práctica de la lactancia exclusiva no interfiriere en la DMO, sin embargo, se observó que el propio proceso reproductivo entre las adolescentes implica limitar su pico de masa ósea máxima, exponiéndolas a mediano o largo plazo a desgaste óseo.

La principal limitación de este estudio fue no contar con niveles séricos o iónicos de calcio ni la ingesta de éste dentro de las variables confusoras, así como tampoco contar con evaluaciones previas al embarazo que realmente determinen un estado basal y fisiológico, además de tener una diferencia relativamente

TABLA 2B. DMO según concentración de osteocalcina a los 15 dpp y duración de la práctica de lactancia exclusiva.

Osteocalcina ng/mL	Tiempo de lactancia (en meses)					
	0		1-5		6 y más	
	≤5 n=15	≥6 n=12	≤5 n=13	≥6 n=12	≤5 n=12	≥6 n=9
DMO (dpp)						
L2-L4 ‡						
15	0,993±0,1	1,126±0,1	1,092±0,2	1,169±0,2	0,984±0,2	1,082±0,1
90	1,078±0,1	1,127±0,1	1,118±0,1	1,150±0,2	1,055±0,1	1,097±0,1
360	1,130±0,1	1,189±0,1	1,178±0,1	1,199±0,2	1,115±0,1	1,138±0,1
Cuello de fémur †						
15	0,990±0,1	1,056±0,1	0,966±0,2	0,730±0,1	0,990±0,1	0,048±0,1
90	1,005±0,1	1,036±0,1	0,964±0,2	1,050±0,1	1,004±0,1	1,044±0,1
360	1,044±0,1	1,056±0,1	0,992±0,2	1,050±0,1	1,038±0,1	1,045±0,1
Triángulo de Wards †						
15	0,868±0,1	0,954±0,2	0,876±0,2	0,995±0,2	0,824±0,2	0,940±0,1
90	0,942±0,1	0,946±0,2	0,893±0,2	0,984±0,2	0,920±0,2	0,974±0,1
360	0,975±0,1	0,967±0,2	0,922±0,2	0,969±0,2	0,936±0,2	0,961±0,1
Trocánter						
15	0,736±0,1	0,766±0,1	0,721±0,1	0,790±0,1	0,732±0,1	0,786±0,1
90	0,778±0,1	0,786±0,1	0,743±0,1	0,777±0,1	0,774±0,1	0,754±0,1
360	0,810±0,1	0,801±0,1	0,761±0,1	0,789±0,1	0,785±0,1	0,773±0,1

Datos presentados en media ± desviación estándar. Análisis de datos repetidos. DMO: densidad mineral ósea, dpp: días posparto

‡ Intrasujetos y entre sujetos tiempo p <0.001, osteocalcina p < 0.040

† Intrasujetos tiempo p <0.001, osteocalcina p <0.001, entre sujetos tiempo p <0.001

TABLA 3. Correlación de Spearman entre las variables asociadas con los marcadores óseos

Variable	Tiempo de medición(días pp)			
	15	90	180	365
N telopéptidos (µg/L)				
Edad ginecológica (años)	-0,181	-0,502**	-0,371**	-0,573**
Tiempo de lactancia (meses)	0,127	-0,243*	-0,338**	-0,154
Reinstalación de la menstruación (meses)	0,159	-0,082	-0,244*	-0,092
PTHi (ng/L)				
Tiempo de lactancia (meses)	-0,052	-0,242*	0,007	0,006
Progesterona (ng/mL)				
Edad ginecológica (años)	0,017	-0,296*	-0,177	-0,124
Osteocalcina (ng/mL)				
Edad ginecológica (años)	0,431**	0,389**	0,573**	0,600**

Valor Rho *p<0,050 , **p<0,001

corta entre las edades de los grupos estudiados, pues esto podría limitar hasta cierto punto el encontrar mayores diferencias. Sin embargo, su principal fortaleza es la relativamente baja tasa de deserción y las múltiples determinaciones a largo plazo que reflejan de mejor manera el patrón fisiológico de los biomarcadores óseos correlacionados con la lactancia y la densidad mineral ósea.

Finalmente, se concluyó que en los N-telopéptidos alcanzaron su mayor concentración a 15dpp, disminuyendo con el tiempo, una menor concentración se asoció a más aumento de DMO al año postparto, sin asociación por práctica de lactancia. La osteocalcina no mostró cambios significativos con el tiempo y su concentración se asoció con el cambio en la DMO.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las mujeres que participaron en el estudio, así como a la Coordinación de Medicina del Adolescente y al Departamento de Climaterio del INPer por las facilidades otorgadas para la realización de la presente investigación.

REFERENCIAS

- Gordon CL, Halton JM, Atkinson SA, Weber CE. The contributions of growth and puberty to Peak bone mass. *Growth Dev Aging* 1991; 55:257-262.
- Orito S, Kuroda T, Onoe Y, Sato Y, Ohta H. Age-related distribution of bone and skeletal parameters in 1,322 Japanese young women. *J Bone Miner Metab* 2009; 27(6):698-704.
- Glerean M, Furci A, Galich AM, Fama B, Plantalech L. Bone and mineral metabolism in primiparous women and its relationship with breastfeeding: a longitudinal study. *Medicina* 2010; 70(3):227-32.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-137.
- Specker B, Bincley T. High parity is associated with increased bone on bone size and strength. *Osteoporos Int* 2005; 16(12):1969-1974.
- Bjoerm H, Christian E, Feld M, Zichner L, Kurth A. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cement less total hip replacement. *Acta Orthopaedica* 2007; 78:221-225.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop Scand* 1995; 266 (suppl):176-182.
- Seifert-Klaus V and Prior JC. Progesterone and Bone: Actions Promoting Bone Health in Women. *J Osteoporos* 2010; 2010: 1-18.
- Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, et al. Parathyroid Hormone and teriparatida for the treatment of osteoporosis: A review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocrine Rev* 2005; 26:688-703.
- Sosa-Henríquez M., Díez Pérez A. La hormona paratiroidea en el tratamiento de la osteoporosis. *An Med Interna* 2007; 24(2):87-97.
- Basabe-Tuero B, Mena Valverde MC, Faci Vega M, Aparicio Vizuete A, López Sobaler AM, Ortega Anta RM. Influencia de la ingesta de calcio y fósforo sobre la densidad mineral ósea en mujeres jóvenes. *Arch Latinoam Nutr* 2004; 54(2):203-208.
- Pearson D, Kaur M, San P, Lawson N, Baker P, Hosking. Recovery of pregnancy mediated bone loss during lactation. *Bone* 2004; 34:570-578.
- Rivera-Dommarco J, Shamah T, Villalpando S, González-Cossío T, Hernández Prado B, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de la Nutrición 1999, México. Instituto Nacional de Salud Pública 2001.
- Sámano R, Morales RM, Flores-García A, Lira J, Isoard F, De-Santiago S, et al. Las adolescentes no pierden densidad mineral ósea en el posparto: estudio comparativo con adultas. *Salud Publica Mex* 2011; 53(1):2-10.
- González B, De Freitas H, Peinado M. Correlación de la osteocalcina y de los N-telopéptidos con la densitometría ósea en mujeres postmenopáusicas de Cumaná, Estado Sucre. *Saber* 2002; 14(1):48-54.
- Recomendación de la OMS sobre la alimentación del lactante. Organización Mundial de la Salud. Página en Internet http://www.who.int/nutrition/topics/infantfeeding_recommendation/es/ Consultado 3 de abril de 2014)
- Cortés Blanco A, Labarta Aizpún JI, Ferrández Longás A, Mayayo Dehesa E, Valores de referencia de IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-3 y osteocalcina en niños sanos zaragozanos. *An Esp Ped* 1999; 51(2):167-174.
- Bezerra F, Cabello G, Mendonça L, Donangelo CM. Bone mass and breast milk calcium concentration are associated with vitamin D receptor gene polymorphisms in adolescent mothers. *J Nutr* 2008; 138:277-281.
- Marco GL, Rodríguez VG, Valtueña J, Rey-López JP, Díaz-Martínez AE, Mesana MI, et al. Marcadores del metabolismo óseo en adolescentes españoles. *Estudio HELENA. Trauma* 2009; 21(1):33-38.
- Lippuner K, Zehnder H, Casez JP, Takkinen R, Jaeger

- P. PTHrP released into the mother's bloodstream during lactation: evidence for beneficial effects on maternal calcium-phosphate metabolism. *J Bone Miner Res* 1996; 11(10):1394-1399.
21. Vargas-Zapata CL, Donangelo CM, Woodhouse LR, Abrams SA, Spencer EM, King JC. Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy and lactation in Brazilian women with low calcium intakes: A longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:417-422.
 22. Thomas M, Weisman SM. Calcium supplementation during pregnancy and lactation: effects on mother and fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:937-945.
 23. De Santiago S, Halhali A, Frenk S, Bourges H. Calcio y fosfato. En Bourges H, Casanueva E, Rosado JL. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. Edit. Médica Panamericana 2005; Tomo 1:217-229.
 24. Cattani O Andreina, Zubarew G Tamara, Maddaleno H Matilde, Mosso G Lorena, López M José Manuel. Recambio óseo en nodrizas adolescentes: evaluación al término de la gestación, lactancia y postdestete. *Rev Med Chile* 2000; 128(2): 145-153.
 25. Boot AM, de Ridder MA, van Der Sluis IM, van Slobbe I, Krenning EP, Keizer-Schrama SM. Peak bone mineral density, lean body mass and fractures. *Bone*. 2010;46(2):336-341
 26. Carneiro RM, Prebehalla L, Tedesco MB, Sereika SM, Hugo M, Hollis BW. Lactation and bone turnover: A conundrum of marked bone loss in the setting of coupled bone turnover *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(4):1767-1776.

Recibido: 07-02-2014

Aceptado: 24-04-2014

Healthy eating index of elderly: description and association with energy, macronutrients and micronutrients intake

Vera Elizabeth Closs, Ana Maria Pandolfo Feoli, Irenio Gomes, Carla Helena Augustin Schwanke

Institute of Geriatrics and Gerontology - Pontifical Catholic
University of Rio Grande do Sul (PUCRS). Brazil.

SUMMARY. The purpose of this study was to define the Healthy Eating Index (HEI) of the elderly of Southern Brazil and its association with energy, macronutrients and micronutrients intake. A cross-sectional study was conducted with 186 elderly aged 60 and older of the Geriatric Service of São Lucas Hospital, Porto Alegre, Brazil. Dietary data were collected by two 24-hour recalls, and diet quality was assessed by HEI adapted to the Brazilian population. The HEI total score was divided into three categories: inadequate diet (below 51 points), diet needs improvement (between 51 and 80 points), and healthy diet (over 80 points). The results showed that the mean HEI score was 58.8 ± 10.5 points (ranging from 31.4 to 79.8). Most elderly (74.2%) showed a diet that needed modification and no elderly individual had a healthy diet. The quality of the diet was associated with greater intake of carbohydrates, and lower intake of total lipids, saturated fatty acids, cholesterol, and sodium. Consumption of vitamins C and D and calcium was shown to be positively correlated with the quality of the diet. Less than 1.1% of the elderly consumed a varied diet. The findings suggest that the diet of the majority of the elderly needs improvement, reinforcing the importance of care in relation to adequate nutrition in this population, and can help in guiding the activities and programs of nutritional education and public policies that stimulate increasingly healthy eating.

Key words: Nutrition assessment, nutritional status, nutrition policy, aged, Healthy Eating Index.

RESUMO. Índice de alimentação saudável de idosos: descrição e associação com ingestão de energia, macronutrientes e micronutrientes. O objetivo deste estudo foi descrever o Índice de Alimentação Saudável (IAS) de idosos do Sul do Brasil e sua associação com a ingestão de energia, macronutrientes e micronutrientes. Foi realizado um estudo transversal com 186 idosos com 60 anos ou mais, do Serviço de Geriatria do Hospital São Lucas, Porto Alegre, Brasil. Os dados relativos ao consumo alimentar foram coletados através de dois recordatórios de 24 horas, e a qualidade da dieta foi avaliada pelo IAS, adaptado à população brasileira e o escore total foi dividido em três categorias: dieta inadequada (abaixo de 51 pontos), dieta necessitando de adequação (entre 51 e 80 pontos), e dieta saudável (mais de 80 pontos). Os resultados mostraram que a média do IAS foi $58,8 \pm 10,5$ pontos (variando de 31,4 a 79,8 pontos). A maioria dos idosos (74,2%) apresentou uma dieta que necessitava de modificação e nenhum idoso tinha uma dieta saudável. A qualidade da dieta foi associada com maior ingestão de carboidrato e baixa ingestão de gordura total, gordura saturada, colesterol e sódio. O consumo de vitaminas C e D e cálcio mostrou-se positivamente correlacionado com a qualidade da dieta. Menos de 1,1% dos idosos consumia uma dieta variada. Os resultados sugerem que a dieta da maioria dos idosos necessita de adequação, reforçando a importância dos cuidados em relação à nutrição adequada desta população e podem auxiliar na orientação de atividades e programas de educação nutricional e políticas públicas que estimulem a prática de uma alimentação mais saudável.

Palavras-chave: Avaliação nutricional, estado nutricional, recomendações nutricionais, idoso. Índice de Alimentação Saudável.

INTRODUCTION

The Brazilian population, as in other countries around the world, is aging at an unprecedented rate (1). Accordingly, greater importance is given to integral health in the aging process, and nutrition plays an important role in healthy living and in the prevention and treatment of diseases. This is especially important for the elderly, for whom

an adequate nutrition is crucial in maintaining not just good health but also functionality (2).

Distortions in the diet of the elderly reveal the importance of the application of a tool to evaluate food consumption as a whole and also with regard to each of the components (3). Accordingly, the indices of diet quality are instruments that can be used to determine the eating habits of the elderly (2,3).

However, few studies have evaluated patterns of die-

tary intake in the elderly population (4). Better knowledge of the usual diet of the elderly is essential for the implementation of preventive initiatives in primary healthcare assistance and for the proposal of more effective dietary interventions.

Since the past century, various guidelines have been proposed (5), and many indices have been developed for evaluating the diet of individuals in relation to dietary recommendations (6,7). The Healthy Eating Index (HEI) (8) was developed to assess and evaluate the quality of the diet of the population and was considered by the American Dietetic Association as an appropriate instrument for this purpose. Some authors have adapted the HEI for different populations, such as Fisberg et al. (3,9), who applied the HEI to the Brazilian population, with the necessary modifications. The objective of this study was to define the HEI of the elderly of Southern Brazil, and its association with energy, macronutrients and micronutrients intake.

MATERIALS AND METHODS

A cross-sectional study was conducted in the outpatient clinic of the Geriatric Service of São Lucas Hospital of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), in the period of November 2009 to November 2010. In a convenience sample, elderly individuals 60 years and older were invited to participate, and those with cognitive decline, restricted mobility and severe hearing loss, which compromised nutritional assessment, were excluded. A sample size of 200 elderly was calculated as adequate, on the basis of a pilot study. The final sample comprised 186 elderly because 14 did not complete the data. An alpha error of 5% and power of 80% were considered. The procedures were approved by the Research Ethics Committee of PUCRS and all participants signed an informed consent form.

Two 24-hour dietary recall data (R24h) were collected with a minimum interval of two weeks, one regarding the intake of a weekend day and the other one of a weekday. The nutritional values and the chemical composition of diet were calculated using Dietwin®2008, which was fed data from the Brazilian Table of Food Composition (TACO) version 2 and food labels. The averages of the data of the two recalls were then calculated. Total energy intake (TEI), total carbohydrates, proteins, lipids, monounsaturated

(MUFA), polyunsaturated (PUFA), saturated (SFA) fatty acids and cholesterol were selected for the analysis. The micronutrients examined were those that, as noted in other studies, evaluated diet quality of the elderly (8,10,11). Vitamin D was included, despite no other publication mentioned it, because of its importance in clinical practice and the high prevalence of deficiency among Brazilian people (12,13). The socio-demographic data were obtained using a structured questionnaire.

The HEI adapted to the Brazilian population (3,9) was used to evaluate the dietary quality. The index consists of a score of 10 equally weighted components, each with a minimum score of zero and a maximum of 10, with intermediate values calculated proportionally, and resulting in a total score range of 10 to 100. The first five HEI components measure compliance of the consumption of grains, fruits, vegetables, meat and eggs, dairy products and pulses with the recommended number of servings, according to sex and age, of the Food Guide Pyramid, also adapted for the Brazilian population (6). The next three components measure compliance with recommended intake (11) of total fat, cholesterol and sodium; and the final component, the dietary variety was measured considering the minimum of 5 and a maximum of 15 different foods consumed in a day (Table 1).

TABLE 1. Components of Healthy Eating Index - number of servings, amount of total fat, cholesterol, sodium, and different foods consumed per day for a total energy intake of 1600 kcal

Components of Healthy Eating Index	Criteria for score
Grains, breads, tubers and roots	5 servings
Vegetables	4 servings
Fruits	3 servings
Milk and dairy products	3 servings
Meat and eggs	1 serving
Pulses	1 serving
Total fat	30%-45% of total energy intake
Cholesterol	300-450 mg
Sodium	2,400-4,800 mg
Variety of diet	5-15 different types of foods a day

Source: (3,6,9,11)

The total score was categorized as: inadequate diet (below 51 points), diet needs improvement (between 51 and 80 points), and healthy diet (over 80 points) (9,12).

Data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 17.0. Measures of central tendency, dispersion and proportion were used in the descriptive analysis of data. Mean HEI scores were compared using Student's t test, and the Pearson coefficient was calculated to determine the correlation between HEI and percentage of macronutrients of TEI and micronutrients. Level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

TABLE 2. Distribution of elderly according to sociodemographic characteristics (n=186).

Characteristic	Frequency N (%)
Sex	
Male	34 (18.3)
Female	152 (81.7)
Age range (years)	
60-70	54 (29.0)
71-80	98 (52.7)
81-93	34 (18.3)
Marital status	
Married	63 (33.9)
Single	14 (7.5)
Separated/divorced	27 (14.5)
Widowed	82 (44.1)
Race	
White	152 (81.7)
Black	20 (10.8)
Yellow	1 (0.5)
Brown	13 (7.0)
Schooling	
Completed primary education	114 (61.3)
Did not complete primary education	49 (26.3)
No schooling	23 (12.4)
Retired	
Yes	145 (78.0)
No	41 (22.0)
Personal income (MS)*	
Up to 1	72 (38.7)
> 1 to 3	95 (51.1)
> 3	19 (10.2)
TOTAL	186 (100)

*MS=Minimum salary (US\$ 320/month).

RESULTS

The mean age of the sample was 74.3 ± 7.1 years (range 60-93 years) and other sociodemographic data are described in Table 2.

The mean overall HEI score of the total sample was 58.8 ± 10.5 and ranged from 31.4 to 79.8 points. No participant showed a healthy diet, while 74.2% of them had a diet that needed improvement and 25.8% an inadequate diet.

The largest percentages of elderly meeting dietary recommendation (Table 3) were for cholesterol (68.3%) and sodium (62.9%). According to these results, the same components produced the highest mean scores, i.e., 8.91 and 8.96, respectively.

The lowest mean scores were found for meats and eggs (3.55), fruits (3.82) and in the pulse group (3.90). The highest percentages of inadequate intake were also observed in these components, with meats and eggs (47.8%) and pulses (39.8%) being higher than fruits (21%).

There was no significant association between the amount of TEI and the quality of diet. An inadequate diet was associated with a lower carbohydrate intake ($P=0.024$) and higher lipid intake ($P=0.033$). A decrease in the intake of SFA ($P=0.010$), cholesterol ($P=0.002$), and sodium ($P=0.011$) improved diet quality. (Table 4)

The statistical association between HEI and intake levels of macronutrients and micronutrients was equally confirmed by the correlation coefficient presented in Table 5. A weak direct association was observed with carbohydrates ($P=0.001$), vitamin C ($P=0.047$), vitamin D ($P=0.025$) and calcium ($P=0.004$); there was a moderate inverse association with SFA ($P < 0.001$), and cholesterol ($P < 0.001$), and weak inverse association with total fat ($P < 0.001$), MUFA ($P=0.011$) and sodium ($P=0.002$). TEI, percentage of protein of TEI, PUFA, vitamins A, B and E, iron, magnesium and zinc did not demonstrate a correlation with HEI.

DISCUSSION

Before the main analysis it is important to highlight that the higher percentage of women in the sample reflects the national phenomenon of feminization of aging observed in the Brazilian age pyramid (1).

TABLE 3. Median, mean, standard deviation and confidence interval of scores of each component of the Healthy Eating Index of elderly, and percentage of observations with minimum and maximum score (n=186).

	Score		95% CI	Score 0	Score 10
	Median	Mean±SD		%	%
Grains, breads, tubers and roots	6.00	6.04±2.54	5.67-6.40	5.4	6.5
Vegetables	3.75	4.29±2.36	3.95-4.64	3.2	2.2
Fruits	3.33	3.82±2.96	3.39-4.25	21.0	6.5
Milk and dairy products	5.00	4.78±2.80	4.38-5.19	15.6	4.8
Meats and eggs	5.00	3.55±3.83	2.99-4.10	47.8	18.8
Pulses	5	3,90±3,64	3.37-4.42	39.8	17.7
Total fat	9.73	8.64±1.90	8.37-8.92	0.5	47.8
Cholesterol	10.00	8.91±1.99	8.63-9.20	0.5	68.3
Sodium	10.00	8.96±1.96	8.67-9.24	0.5	62.9
Variety of diet	5.99	5.93±2.04	5.63-6.22	2.7	1.1

SD: standard deviation CI: confidence interval.

TABLE 4. Mean and standard deviation of energy intake, percentage of macronutrients of total energy intake and micronutrients in relation to categories of Healthy Eating Index of elderly (n=186).

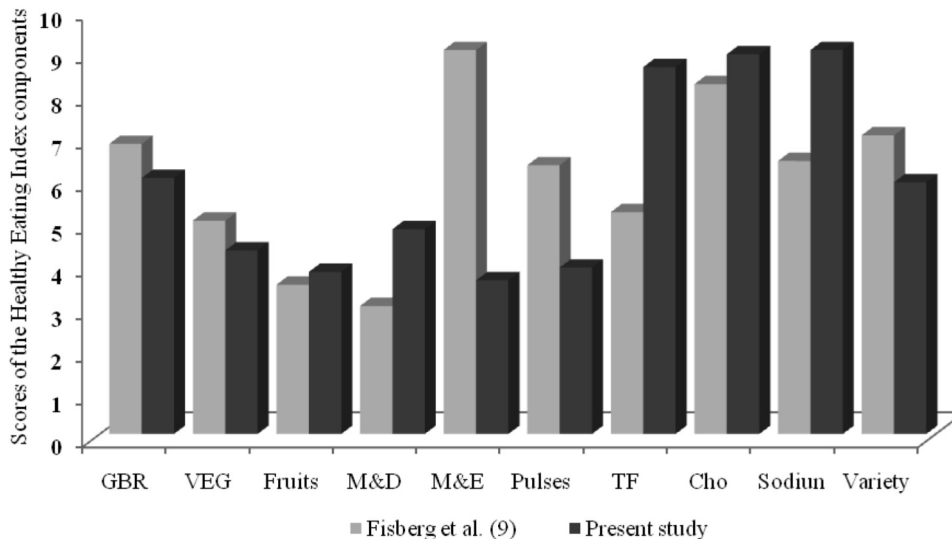
Nutrients	Total (Mean±SD)	Classification of diet according to HEI		P*
		Inadequate diet	Diet needs improvement	
		(n=48)	(n=138)	
TEI (kcal)	1454.4±452.4	1533.5±594.6	1426.8±390.0	0.251
Macronutrients (% of TEI)				
Carbohydrates	55.2±8.1	52.4±10.7	56.2±6.8	0.024
Protein	17.1±3.5	17.6±4.7	16.9±3.1	0.357
Lipids	27.2±6.5	29.3±8.3	26.5±5.6	0.033
MUFA	7.2±2.8	8.0±3.6	6.9±2.4	0.054
PUFA	3.6±1.6	3.5±1.5	3.6±1.7	0.774
SFA	9.4±3.1	10.6±3.9	9.0±2.7	0.010
Cholesterol (mg)	194.6±141.7	275.0±225.3	166.6±81.6	0.002
Micronutrients				
Vitamin A–Retinol (µg)	470.0±1850.8	921.3±3571.0	313.0±394.4	0.245
Vitamin B1–Thiamine (mg)	0.8±0.9	0.7±0.4	0.8±1.0	0.492
Vitamin B2–Riboflavin (mg)	1.2±0.6	1.3±0.8	1.2±0.6	0.403
Vitamin B6–Pyridoxin (mg)	0.7±0.3	0.7±0.3	0.7±0.3	0.588
Vitamin B9–Folate (µg)	73.5±63.1	74.7±63.7	73.1±63.1	0.876
Vitamin C–Ascorbic acid (mg)	91.7±87.1	82.5±1414.1	94.9±75.8	0.396
Vitamin D–Cholecalciferol (µg)	3.0±2.1	2.9±2.5	3.1±1.9	0.633
Vitamin E–Tocopherol (mg)	4.1±3.4	4.7±3.8	3.9±3.3	0.203
Calcium (mg)	638.6±305.0	582.5±343.5	658.1±289.8	0.140
Iron (mg)	8.0±14.1	7.8±3.8	8.1±16.3	0.894
Magnesium (mg)	247.0±127.3	255.8±186.0	244.1±100.1	0.677
Sodium (mg)	1667.3±860.2	1993.5±1085.2	1553.9±738.2	0.011
Zinc (mg)	7.4±3.8	8.3±5.3	7.1±3.2	0.138

SD: standard deviation HEI: Healthy Eating Index TEI: total energy intake, MUFA: monounsaturated fatty acids PUFA: polyunsaturated fatty acids SFA: Saturated fatty acids. *P= calculated by Student t test.

TABLE 5. Correlation coefficient between Healthy Eating Index and percentage of macronutrients of total energy intake and micronutrients of diet of elderly (n=186).

Nutrients	Healthy Eating Index	
	r*	P
Percentage carbohydrates of TEI	0.248	0.001
Percentage total fats of TEI	-0.273	<0.001
Percentage saturated fatty acids of TEI	-0.441	<0.001
Percentage monounsaturated fatty acids of TEI	-0.187	0.011
Cholesterol	-0.305	<0.001
Vitamin C—ascorbic acid	0.146	0.047
Vitamin D—cholecalciferol	0.165	0.025
Calcium	0.209	0.004
Sodium	-0.229	0.002

TEI: total energy intake.*Pearson linear correlation.



GBR: Grains, breads, roots and tubers; VEG: Vegetables; M&D: Milk and dairy products; M&E: Meats and eggs; TF: Total fat; Cho: Cholesterol; Variety: variety of foods.

FIGURE 1. Comparison of the scores of the Healthy Eating Index components between our study (n=186 elderly) and that of Fisberg et al. (9) (n=3,454 individuals, 20 years and older).

The first objective of this study was to describe the HEI in the target population, and the results suggest that the elderly evaluated did not have a healthy diet. There are very few studies that have evaluated HEI in samples composed exclusively of elderly. Studies in the North American population (2,4,7,8,14), with similar methodology, revealed scores between 61.9 and 67.6, which were higher than our findings (58.8). Studies carried out in the Brazilian population (9,15,16) obtained scores that ranged from 56.9 to 66.6; how-

ever, two of them (9,15) evaluated adults in general, and Louzada et al. (16) used another methodology.

When participants were categorized, our results showed that most individuals (74.2%) had a diet needing improvement, proving to be within the range (67.0 to 80.9%) of previous studies (2,4,8,9,14).

In the present study, none of the elderly was classified as having a diet that could be considered healthy, which has not been reported in any previous studies. This finding, along with the fact that 25.8% of participants had a diet considered poor, higher than that found in the literature (8.0 to 21.6%), doubly suggests that the diet of the elderly is not adequate (2,4,8,9,14).

Figure 1 illustrates the comparison between the scores of the HEI components of this study with the results of Fisberg et al. (9), whose methodology served as the basis for our survey. However, it

should be noted that only 13% of their sample consisted of elderly individuals, which may hamper the comparison of results. In addition, methodological differences with other studies allowed only some components of HEI to be reliably compared.

(Insert Figure 1)

In the comparison with the study of Fisberg et al. (9), individuals in our sample showed lower scores (6.0 vs. 6.8) in relation to the consumption of grains, bread, tubers and roots, but the mean score of that

group was close to that of the majority of other studies (2,14,15). Increased intake of cereals and whole grain breads is recommended, but is not an easy task, because these foods are not usually present in the diet of Brazilians. Surveys have demonstrated a 40.5% decrease in the consumption of rice in Brazil, between 2003 and 2009 (17). In addition to that, the high prevalence of poor oral health among the elderly, reducing chewing efficiency, can cause restrictions in fibrous food consumption (18).

In relation to vegetables, it was found that the frequency of regular intake of these foods increased with age in adults living in Brazilian capitals (19). However, in the present study, the score of vegetables (4.3) was lower than that observed in other works (2,7,9,14). Only 2.2% of the elderly consumed the recommended amount of vegetables. Part of this could be explained by the fact that more than half of our sample comprised elderly with income between one and three times minimum salary and that there is a positive association between frequency of vegetable consumption per capita with income level (17).

The consumption of fruits showed inadequacy in our study as well as that by Fisberg et al. (9), with low scores, 3.8 and 3.5, respectively, and this result is not surprising because surveys indicate a low intake of fruits by the Brazilian population, less than half that recommended by the Food Guide for the Brazilian Population (17,19). Loss of appetite, difficulty in food acquisition and preparation, movement, chewing, swallowing, and diseases such as depression and dementia are also associated with low consumption of fruits and vegetables in the elderly (18).

The dairy group score showed a greater adequacy in intake than that found by Fisberg et al. (9), though still low as observed by other authors (2,7,14), and according to the behavior of the Brazilian elderly, that shows an unsatisfactory consumption of dairy products (17). Low consumption of these foods among the elderly may be related to the fact that some elderly people have lactose intolerance, which is very common in the aging process (18).

The score of meat and eggs (3.6) among the elderly evaluated was much lower than that observed by Fisberg et al. (9.0) (9). Perhaps these findings can be explained by the fact that the sample analyzed by those authors consisted of younger individuals (mean age 41.3 vs. 74.3 years) and included 66.3% actively wor-

king persons as opposed to 78.0% retired persons in our sample. Conversely, less consumption of meat can be related to oral and dental problems, common among elderly, as well as to the lower purchasing power of this population due to retirement (18). The consumption of eggs has diminished considerably in Brazil, probably due to the fact that their consumption has been replaced by the purchase of industrialized foods, consequently decreasing the use of eggs in homemade preparations (19).

As regards to pulses, national data show a reduction of 26.4% in the consumption of beans during the period 2003-2009, with people showing increased interest in industrialized and less healthy foods (17,19). Surveys have reported that the regular consumption of beans has decreased (17,19), which may explain the lower scores between our elderly and individuals analyzed by Fisberg et al. (3.9 vs. 6.3) (9).

The elderly evaluated had a greater adequacy in intake of total fat, cholesterol, and sodium than those of other studies previously reported (2,17,9,14,15,16), and this better performance may be explained by the fact that the elderly, in general, have multiple diseases and chronic treatments. In this case, they could have received nutritional guidance or could represent the possibility of reverse causality, where with aging, developing diseases are responsible for dietary behavior modification.

Finally, less than 1.1% of the elderly ate a varied diet, with a score of 5.9 for this component, not in line with data in literature, showing considerably higher values both in the Brazilian and North American population (2,9,14,15). It could be considered that elderly nutrition shows a pattern and systematization different from that of younger people. These individuals have very entrenched eating habits, where they are not receptive to new foods, resulting in general in a diet poor in variety (21).

It is important to highlight that Brazil is a country with continental dimensions and many differences between regions with regard to food consumption, which is evident in the analysis of the data from the latest Family Budget Research, conducted by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) (17), and that can explain differences between our results and those obtained in the study of Fisberg et al. (9) conducted on a population of a distinct region.

To respond to the second aim of this study, we exa-

mined the association between HEI, food energy and macronutrients. TEI was not associated with HEI, indicating that the greater consumption of a certain amount of energy, by itself, does not improve HEI (8). However, the index was related to the intake of carbohydrates, total fat, SFA, cholesterol and sodium. A healthier diet associated with an increase in carbohydrate intake has not been demonstrated in similar study (22) and may initially suggest an inappropriate result, however, it is important to note that the Dietary Reference Intake (DRI) (11) mentions that carbohydrates should match 45 to 65% of TEI. Therefore, it seems that the percentage (56%) of carbohydrates consumed by the elderly with a better index, more closely approximated the average recommended intake, i.e. 55%. Research carried out in Brazil showed that over the past 30 years, there was a decrease in the relative participation of complex carbohydrates in food composition, approaching the recommended lower limits, with fats offsetting the lower carbohydrate levels, a change considered detrimental to health and conducive to the risk of chronic diseases (19).

The quality of diet related to a decrease in the quantity of SFA, cholesterol, and sodium is mentioned in the literature (2,22) and this relationship found here is important because it shows that the diet of the elderly evaluated has positive characteristics that confirm the recommendations related to these foods established in the main guidelines as preventing chronic diseases (11,19).

The analysis of diet quality in relation to vitamins and minerals, the ultimate goal of this study, was not among the objectives of the majority of the studies on HEI (2,4,7,12,16). Kennedy et al. (8), however, conducted this analysis and obtained a positive correlation for some of these nutrients. In our study, this correlation was not observed for the majority of the micronutrients studied, except for vitamin C, vitamin D and calcium. This finding is relevant because it indicates that the index based on the Brazilian Food Guide Pyramid was able to reflect the adequacy of these important nutrients to elderly health: vitamin C, in the resistance to infections and with antioxidant action, and vitamin D and calcium, in bone metabolism among other functions (18).

There are some limitations in this study that should be noted. First, our sample consisted of elderly in an outpatient clinic of a geriatric service, with particular

characteristics, and therefore, the results should not be extrapolated to the general population. The other limitations refer to the collection, handling and analysis of the dietary inquiries. R24h, despite being a much utilized instrument in epidemiological studies, has limitations, mainly when used to study the elderly. In the analysis of the data, there are difficulties inherent to the correct identification of foods, as well as the quantification of recipes and preparations and also limitations in the programs for the chemical analysis of foods in the diet, based on available sources, which are sometimes limited or incomplete in terms of nutrients, particularly micronutrients. To overcome these limitations, researchers have excluded from the sample elderly with cognitive decline, as well as obtaining two R24h. Finally, only one nutritionist evaluated all the dietary recalls, with respect to the foods, quantity, mode of preparation, and count of variety, in attempt to standardize the information that was entered in program for calculating diet.

CONCLUSION

The results suggest that the diet of the majority of the elderly evaluated needs improvement, mainly with regard to the consumption of meat, eggs, fruits, pulses, vegetables and dairy products. The quality of the diet was associated with greater intake of carbohydrates and lower intake of lipids, SFA, cholesterol and sodium. Consumption of vitamin C, vitamin D and calcium was shown to be positively correlated with the quality of the diet. Less than 1.1% of the elderly consumed a varied diet. HEI provided indications for the need of the elderly to modify the quality of their diets in these respects, aiming to make their eating habits comply more with nutritional recommendations and dietary guidelines.

The information obtained in the investigation of HEI of the elderly reinforces the importance of care in relation to the adequate nutrition of this population and can help in guiding the activities and programs of nutritional education, and public policies that stimulate increasingly healthy eating.

REFERENCES

1. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censos Demográficos. Available in: <<http://www.ibge>.

- gov.br>. (accessed Sep 2013).
2. Ervin RB. Healthy Eating Index Scores Among Adults, 60 Years of Age and Over, by Sociodemographic and Health Characteristics: United States, 1999–2002. Advance data from vital and health statistics 395. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics; 2008.
 3. Fisberg RM, Slater B, Barros RR, Lima FD, Cesar CLG, Carandina L, Barros MBA, Goldbaum M. Índice de qualidade da dieta: avaliação da adaptação e aplicabilidade. *Rev Nutr PUCCAMP*. 2004;17(3):301-8.
 4. Guo X, Warden BA, Paeratakul S, Bray GA. Healthy Eating Index and obesity. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(12):1580-6.
 5. Welsh S. Atwater to the Present: Evolution of Nutrition Education. *J Nutr*. 1994;124:1799S-1807S.
 6. Philippi ST, Latterza AR, Cruz ATR, Ribeiro LC. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha dos alimentos. *Rev Nutr PUCCAMP*. 1999;12:65-80.
 7. Gao SK, Beresford SAA, Frank LL, Schreiner PJ, Burke GL, Fitzpatrick AL. Modifications to the Healthy Eating Index and its ability to predict obesity: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:64-9.
 8. Kennedy ET, Ohls J, Carlson S, Fleming K. The Healthy Eating Index: design and applications. *J Am Diet Assoc*. 1995;95:1103-9.
 9. Fisberg RM, Morimoto JM, Slater B, Barros MBA, Carandina L, Goldbaum M, Latorre MRDO, César CLG. Dietary Quality and Associated Factors among Adults Living in the State of São Paulo, Brazil. *J Am Diet Assoc*. 2006;106:2067-72.
 10. Hsiao PY, Mitchell DC, Coffman DI, Allman RM, Loche JL, Sawyer P, Jensen GL, Hartman TJ. Dietary patterns and diet quality among diverse older adults: the University of Alabama at Birmingham study of aging. *J Nutr Health Aging*. 2013;17(1):19-25.
 11. US Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 2010.
 12. Bowman SA, Lino M, Gerrior SA, Basiotis PP. The Healthy Eating Index: 1994-96. Washington DC: Center for Nutrition Policy and Promotion, U.S. Department of Agriculture; 1998.
 13. Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study BRAZOS *Osteoporos Int*. 2009;20:399-408.
 14. Juan WY, Lino M, Basiotis PP. Quality of diets of older Americans. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion; 2004. *Nutrition Insights* 29.
 15. Silva KF, Prata A, Cunha DF. Frequency of metabolic syndrome and the food intake patterns in adults living in a rural area of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(4):425-9.
 16. Louzada MLC, Durgante PC, Marchi RJ, Hugo FN, Hilgert JB, Padilha DMP, Antunes MT. Healthy eating index in southern Brazilian older adults and its association with socioeconomic, behavioral and health characteristics. *J Nutr Health Aging*. 2012;16(1):1-7.
 17. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro; 2011.
 18. Sachs A, Oliveira PA, Magnoni D. Riscos nutricionais na terceira idade In: Magnoni D, Cukier C, Oliveira PA. *Nutrição na terceira idade*. Servier: São Paulo; 2010, p.47-56.
 19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
 20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. *Vigitel Brasil 2011: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília; 2012.
 21. Bós AJG. Características fisiológicas do processo do envelhecimento. In: Busnello FM. *Aspectos Nutricionais no Processo do Envelhecimento*. Atheneu: São Paulo; 2007, p.4-15.
 22. Kant AK, Graubard BI. A comparison of Three Dietary Pattern Indexes for Predicting Biomarkers of Diet and Disease. *J Am Coll Nutr*. 2005;24(4):294-303.

Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA

Heriberto Franco, Aracelly Vega, Stephany Reyes, Javier De León, Alexis Bonilla

Centro de Investigación en Recursos Naturales, Universidad Autónoma de Chiriquí, El Cabrero, Chiriquí.
Programa de Café, Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Chiriquí. Panamá

RESUMEN. Se realizó un estudio de las condiciones del procesamiento del café de exportación en 15 beneficios, ubicados en Chiriquí, región occidental de Panamá. Además se analizaron 21 muestras de café procesado (grano verde), provenientes de los beneficios. Las muestras fueron analizadas microbiológicamente y se cuantificaron las Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2) y Ocratoxina A (OTA), mediante el método de inmunoafinidad ELISA. Se determinó un límite de detección de 0,017 ng/mL, para la Ocratoxina A, lo que equivale a una concentración de 0,829 µg/kg en la muestra, y un límite de detección de 0,027 ng/mL, para las Aflatoxinas totales, lo que equivale a una concentración de 1,350 µg/kg de Aflatoxinas totales. En la muestra, se encontró que cuatro de las 21 (19%) resultaron positivas a la presencia de Ocratoxina A y tres, a la presencia de Aflatoxinas totales (14%). Las muestras presentaron niveles de Ocratoxina A en el rango de 4,90-37,73 µg/kg; sólo tres de ellas superaron el límite máximo permitido por la Unión Europea, para la concentración de Ocratoxina, que es de 5,0 µg/kg. Las Aflatoxinas totales se encontraron en el rango de 1,51- 1,93 µg/kg, por debajo de los 10 µg/kg, que es el límite máximo permitido en el café por la Unión Europea. Los resultados nos indican que el procesamiento de café producido en Panamá cumple satisfactoriamente con los estándares internacionales de manejo poscosecha, lo que conduce a una baja incidencia de hongos productores de micotoxinas y niveles muy bajos de micotoxinas.

Palabras clave: Micotoxinas, Ocratoxina, Aflatoxina, café procesado, método de inmunoafinidad ELISA, manejo poscosecha, Panamá.

SUMMARY. Levels of Ochratoxin A and total Aflatoxins in Panamanian exportation coffee by an ELISA

Method. A study about processing conditions of exportation coffee in 15 benefits located in Chiriquí, western region of Panama, was conducted. In addition, 21 samples of processed coffee (green beans), from the benefits, were analyzed. The samples were microbiologically tested in order to quantify total aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) and Ochratoxin A (OTA), using the immunoaffinity ELISA method. A detection limit of 0.017 ng/mL, was determined for Ochratoxin A, which is equivalent to a concentration of 0.829 µg/kg, and a detection limit of 0.027 ng/mL, for total aflatoxins, which is equivalent to a concentration of 1.350 µg/kg. It was found that four (19%) out of the 21 samples were positive to the presence of Ochratoxin A and three (14%) to the presence of total aflatoxins. Samples showed levels of Ochratoxin A in the range 4.90 - 37.73 µg/kg; only three of them exceeded the maximum limit allowed by the European Union, for the concentration of Ochratoxin, which is of 5.0 µg/kg. Total aflatoxins were found in the range 1.51 - 1.93 µg/kg, below 10µg/kg which is the maximum limit allowed for coffee by the European Union. The results indicate that the processing of coffee produced in Panama successfully meets international standards for postharvest handling, which leads to a low incidence of mycotoxins and very low levels of mycotoxin-producing fungi.

Key words: Mycotoxin, Ochratoxin, aflatoxin, processed coffee, immunoaffinity ELISA method, post-harvest handling, Panama.

INTRODUCCIÓN

Para evaluar los riesgos por exposición a las micotoxinas, se requiere información disponible sobre datos toxicológicos y relativos a su presencia en diversos productos básicos (1). Las micotoxinas están presentes en productos agrícolas infectados, y se conoce que su distribución es extremadamente heterogénea, especialmente en café crudo (2). En la práctica, el incremento o

disminución en los niveles de micotoxinas, en cualquier producto, depende del clima, condiciones de almacenamiento y procesamiento (3). Las micotoxinas son producidas por *Penicillium verrucosum* y miembros de *Aspergillus* subgenus *Circundati*, sección *Circundati*, como: *A. flavus*, *A. melleus*, *A. alliaceus*, *A. parasiticus*, *P. nordicum*, *P. commune*, *P. roqueforti* (4; 5). Las Aflatoxinas son producidas por un número de especies de *Aspergillus*, de las cuales las más im-

portantes en alimentos son *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *A. flavus* produce Aflatoxinas B, mientras que *A. parasiticus* produce las formas B y G. Las Aflatoxinas son las únicas micotoxinas, que no se descomponen por el calor y pueden persistir después del proceso de beneficiado (6). La Ocratoxina A es una micotoxina producida por ciertas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. La Ocratoxina A es un metabolito secundario, su estructura molecular está formada por un anillo de 3,4- dihidro metil isocumarina unido, por medio de su grupo carboxilo y a través de un enlace tipo amida, a una molécula de L-β-fenilalanina (7).

En la actualidad, existen reglamentaciones en donde se indican los límites máximos de micotoxinas permitidos en alimentos (1). En cuanto a las Aflatoxinas totales (suma de B1, B2, G1 y G2), la Unión Europea establece un límite de 10,0 µg/kg para frutos con cáscara destinados a ser sometidos a un proceso de selección u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios. Respecto a la Ocratoxina A, se ha establecido un límite de 5,0 µg/kg para el café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble, y para el café soluble (café instantáneo), de 10 µg/kg. La República de Panamá no cuenta con normativas legales sobre micotoxinas en productos alimenticios.

Las Ocratoxinas y las Aflatoxinas se encuentran algunas veces en muy bajas concentraciones en los alimentos, requiriendo métodos de cuantificación sensibles, confiables, con alto grado de sensibilidad y reproducibles. Entre los métodos de cuantificación más utilizados se encuentran los basados en separación: HPLC con detección por espectrofotometría (8-10), fluorometría acoplado con espectrometría de masas (11), cromatografía en capa fina con densitometría de manchas fluorescentes (12), cromatografía de gas y electroforesis capilar; y los inmunoensayos, como el ensayo inmunoabsorbente, ligado a enzima (ELISA) (13).

Se ha reportado niveles de Ocratoxina A en café instantáneo de 0,32 a 6,40 µg/kg (14), en café tostado 2,17-11,9 µg/kg (15, 16), café verde y café soluble, 2,7 µg/kg y 0,43 µg/kg, respectivamente (15).

Panamá es un país productor de café, siendo la provincia de Chiriquí la que registra mayor producción, principalmente de café para la exportación, el cual ha alcanzado altos precios en el mercado internacional, por su excelente calidad.

En esta investigación se plantearon los siguientes objetivos: evaluar las condiciones del manejo poscosecha del café en regiones productoras de la provincia de Chiriquí, determinar la presencia de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en granos de café procesado y los niveles en que se encuentran, para comprobar si cumplen con las normas internacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Encuesta para obtener información sobre ubicación de beneficios, tiempo de cosecha del café y manejo poscosecha

Se elaboró una encuesta con 8 preguntas cerradas para obtener información relacionada con el manejo poscosecha del café (infraestructura, método de procesamiento, fuente de agua utilizada en el procesamiento, secado del grano y almacenamiento), en beneficios de Boquete, Bugaba, Dolega y Renacimiento de la provincia de Chiriquí. A 17 miembros de las asociaciones de caficultores de las áreas en estudio, se les aplicó la encuesta y se obtuvo información sobre el cultivo de café, aspectos relacionados con el beneficiado del café y las técnicas de poscosecha que estos caficultores practican. Las encuestas fueron procesadas utilizando Excel 2007, con la herramienta de tablas y gráficas dinámicas y porcentaje.

Protocolo de muestreo y tratamiento de las muestras de café

Para el estudio, se consideraron 15 beneficios de la provincia de Chiriquí, que reciben café de 270 fincas productoras, que representan el 100% de la producción de café de exportación en Panamá. Se tomaron 21 muestras de estos beneficios para realizar los distintos ensayos. Las muestras se colectaron el mismo día en cada beneficio, tomando porciones (1 kg aproximadamente), al azar de los lotes que se encontraban en el instante de la colecta. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético y se enviaron al Centro de Investigación en Recursos Naturales de la Universidad Autónoma de Chiriquí, para los análisis fisicoquímicos, microbiológico y para los ensayos de ELISA, con el fin de determinar las micotoxinas.

Determinación de humedad de granos de café

La determinación de humedad se realizó de acuerdo al método oficial de la AOAC 968.11 (16). Se pesaron 20 g de muestra en crisoles previamente secados en un horno y llevados a peso constante. La

muestra se colocó en un horno a 100°C por 8 h, se enfrió en un desecador y se pesó. La humedad se determinó por diferencia del peso inicial y final de la muestra de granos de café.

Análisis microbiológico de las muestras de café

Para el análisis microbiológico, las muestras de café fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% por 10 s, seguido de alcohol 95% por 10 s y posteriormente con agua destilada esterilizada. Se utilizó un medio de cultivo selectivo (Rosa de Bengala, PDA, agar triptófano soya) con antibiótico (cloranfenicol al 0,5%). Se colocaron en platos Petri, con el medio selectivo para su crecimiento, 4 fragmentos de cada muestra de café desinfectada. Lo mismo se hizo con granos de café secos sin desinfectar. El período de incubación fue de 120 h a una temperatura de 25°C en una incubadora con control de temperatura. Después del período de incubación, se procedió al aislamiento de cada colonia, en plato Petri con medio selectivo. Estas colonias se cultivaron en agar papa-zanahoria para la purificación y esporulación masiva. Se realizó la incubación a 25°C por 120 horas y se procedió a la revisión microscópica e identificación de los hongos, utilizando la clave de Barnett&Hunter (17).

Análisis de los niveles de Ocratoxina A y

Aflatoxinas totales, utilizando el método ELISA

Para la extracción de la Ocratoxina A, se emplearon siete gramos de la muestra molida y se extrajeron con 35 mL de metanol al 70%. Se agitó por cinco minutos en un agitador mecánico horizontal; posteriormente, la muestra se filtró, y se tomó del filtrado una parte para diluir en una relación 10:1 con metanol al 70%. La determinación de la Ocratoxina A se hizo siguiendo la metodología proporcionada por el kit de ELISA para Ensayo Cuantitativo de Ocratoxina A en café, cacao y especias (18.); las lecturas de la densidad óptica se hicieron en el analizador automatizado BioteK ELx800.

Para la extracción de Aflatoxinas totales, se utilizaron siete gramos de la muestra de café molido, que se extrajeron con 35 mL de metanol al 80%. Se agitó por dos minutos en un agitador mecánico horizontal, se filtró, se tomó una parte del filtrado y se diluyó en una relación de 1:10 con buffer de ensayo (PBS con 0,05%, Tween 20). La determinación de las Aflatoxinas totales se hizo siguiendo la metodología proporcionada por el kit de ELISA para Ensayo de Aflatoxinas totales, baja matriz (17); las lecturas de la

densidad óptica se realizaron en el analizador automatizado BioteK ELx800. Las curvas de calibración para la cuantificación de Aflatoxinas totales y Ocratoxina A, fueron realizadas con patrones de las siguientes concentraciones: Aflatoxinas (ng/mL): 0, 0,02, 0,05 y 0,1 y Ocratoxina A (ng/mL): 0, 0,02, 0,05, 0,1 y 0,2. Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva (promedio y desviación estándar), utilizando Excel 2007.

RESULTADOS

Se aplicó una encuesta a 13 beneficios de café, específicamente en los distritos de Boquete, Bugaba, Dolega y Renacimiento, ubicados en la provincia de Chiriquí. Según los resultados de la encuesta, el 69% de las empresas beneficiadoras de café reciben este producto de sus proveedores, directamente en sus beneficios y el 31% utiliza recibideros. El 92% de las beneficiadoras practica el beneficiado por vía húmeda y el restante, por vía seca. El 69% del agua utilizada para el beneficiado proviene de acueductos y el 31%, de agua de río. Para el proceso de fermentación, se usan tinajas recubiertas con cemento (46%). El tiempo de fermentación del café varía entre las ocho y las 48 h en los beneficios.

En la Figura 1, se presentan los resultados de la encuesta con relación al tipo de infraestructura y almacenamiento del café en los beneficios.

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis microbiológico realizado a las 21 muestras de café colectadas en los beneficios de las áreas del estudio. Sólo en una muestra del beneficio A, ubicado en Bugaba, se aisló e identificó un hongo productor de micotoxinas, perteneciente a la especie *Penicillium* sp.

En la Tabla 2 se presentan los resultados del porcentaje de humedad que se encontraron en los granos de café procesado de los distintos beneficios estudiados. Las muestras de café contienen una humedad entre 9,2% y 38,6%, con una media de 13,8% \pm 6,3% de desviación estándar.

En la Figura 2, se muestran las curvas de calibración realizadas para el ensayo de cuantificación de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales, por la técnica ELISA. El análisis de regresión lineal de la curva para Ocratoxina A presentó un coeficiente de regresión de $R^2=0,9964$. El análisis estadístico descriptivo efectuado a la curva nos permitió calcular un límite de de-

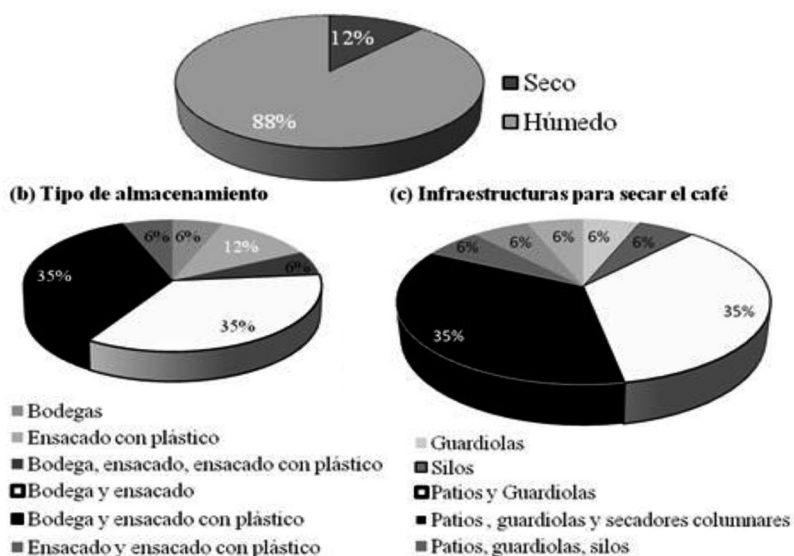


FIGURA 1. Resultado de las encuestas aplicadas a los beneficios de café en la provincia de Chiriquí.

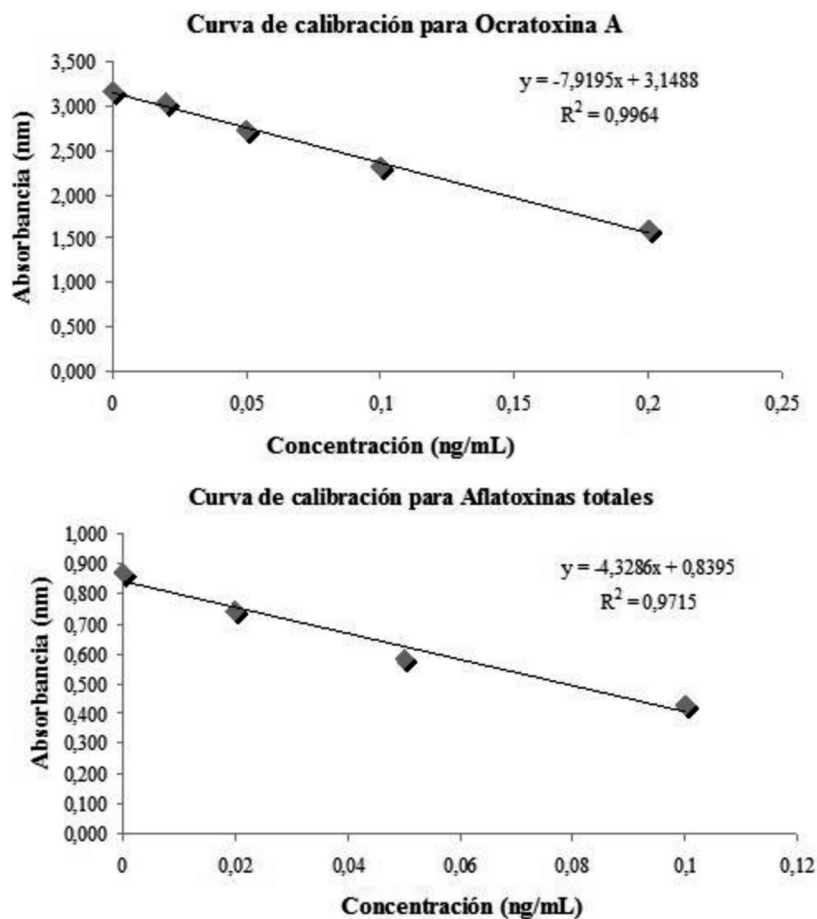


FIGURA 2. Curva de Calibración para Ochratoxina A (a) y Aflatoxinas totales (b).

tección de 0,017 ng/mL, lo que equivale a una concentración de 0,829 µg/kg en la muestra. El análisis de regresión lineal de la curva para Aflatoxinas totales presentó un coeficiente de regresión de $R^2=0,9715$. El análisis estadístico descriptivo realizado a la curva, nos permitió calcular un límite de detección de 0,027 ng/mL, lo que equivale a una concentración de 1,350 µg/kg de Aflatoxinas totales en la muestra.

DISCUSIÓN

La calidad inicial de los granos cosechados, la presencia de hongos productores de micotoxinas, así como las condiciones del sitio de procesamiento, pueden contribuir a la formación de micotoxinas durante el beneficiado húmedo (8).

Con relación al almacenamiento del café, el 46% de los beneficios encuestados guarda su café en sacos y un 38% lo hace en sacos de fibras recubiertos con plástico. Las posibilidades de que el café, almacenado, vuelva a humedecerse, dependen del paso de la humedad de los suelos y muros húmedos, goteras o lluvia impulsada por el viento, inmovilidad del aire y la mezcla de café seco con café húmedo (11).

Si el grano de café, antes del almacenamiento, presentaba contaminación por hongos productores de micotoxinas y la humedad en el área de almacenamiento es alta, el crecimiento de biomasa fúngica se convertirá en un problema crítico. El café se comercializa, mayoritariamente, en grano verde y puede ser almacenado hasta por tres años bajo condiciones de almacenaje controladas. Estas condiciones son: que el grano sea de buena calidad y que el contenido de humedad máxima sea de 12 a 13%, una humedad relativa del ambiente entre 50 a 70% y que la tem-

TABLA 1 Resultados del análisis microbiológico realizado a las muestras de café procesado en los beneficios de Chiriquí, Panamá

Beneficio	Muestra	Hongos identificados
A	1	<i>Cladosporium</i> sp. <i>Gibelula</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.
	2	<i>Cunninghamella</i> sp. <i>Gibelulasp</i> sp.
B	3	<i>Cunninghamella</i> sp.
	4	<i>Cladosporium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.
C	5	<i>Cladosporium</i> sp. <i>Gibelula</i> sp.
D	6	<i>Cladosporium</i> sp. <i>Gibelula</i> sp. <i>Mucor</i> sp.
E	7	<i>Mucor</i> sp. <i>Fusoma</i> sp. <i>Gibelula</i> sp.
	8	<i>Cunninghamella</i> sp. <i>Mucor</i> sp.
F	9	<i>Mucor</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.
G	10	<i>Mucor</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Gibelula</i> sp.
	11	<i>Gibelula</i> sp.
H	12	<i>Cladosporium</i> sp.
	13	<i>Mucor</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.
I	14	<i>Mucor</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.
J	15	<i>Mucor</i> sp.
K	16	<i>Arthrosporium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.
L	17	<i>Arthrosporium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.
M	18	<i>Fusarium</i> sp. <i>Mucor</i> sp.
N	19	<i>Mucor</i> sp.
O	20	<i>Fusarium</i> sp. <i>Mucor</i> sp.
	21	<i>Arthrosporium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.

TABLA 2 Contenido de humedad (%) de las muestras de café procesado en los beneficios de Chiriquí, Panamá

Beneficio	Muestra	*Humedad (%)	Beneficio	Muestra	*Humedad (%)
A	1	13,1 ± 0,1	I	14	9,2 ± 0,1
	2	13,6 ± 0,1			
B	3	11,9 ± 0,1	J	15	10,0 ± 0,2
	4	11,1 ± 0,2			
C	5	10,2 ± 0,2	K	16	9,8 ± 0,3
D	6	11,2 ± 0,3	L	17	14,3 ± 0,1
E	7	21,4 ± 0,2	M	18	9,4 ± 0,2
F	8	11,9 ± 0,3			
G	9	10,9 ± 0,1	N	19	16,0 ± 0,2
	10	16,5 ± 0,2			
H	11	13,2 ± 0,1	O	20	15,4 ± 0,2
	12	11,4 ± 0,1			
	13	11,2 ± 0,3		21	38,6 ± 0,2

*Promedio de 3 mediciones
Media ± SD

peratura se mantenga inferior a los 26°C. Sin embargo, el color y sabor del café van cambiando, poco a poco, incluso con las mejores condiciones de almacenamiento (20, 21).

Sólo en una muestra del beneficio A, ubicado en Bugaba, se aisló e identificó el hongo perteneciente a la especie *Penicillium* sp. El hongo del género *Aspergillus* no se encontró en ninguna de las muestras de café procesado. Los hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*, contaminantes naturales del café, han sido detectados en las diferentes etapas del manejo del producto, y su desarrollo se ve influenciado por diferentes factores, como humedad (22), condiciones ambientales (23), composición del café (24), entre otras. La proliferación del hongo del género *Aspergillus* no se da en las cerezas de café frescas, debido a que otras especies

microbianas presentes (entre ellos, hongos antagonistas de los productores de micotoxinas), protegen de manera natural la cereza de la invasión (25).

Un parámetro que favorece la contaminación por micotoxinas es la actividad de agua (aw), que se define como la relación que existe entre la presión de vapor de un alimento dado en relación con la presión de vapor del agua pura a la misma tem-

TABLA 3 Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en muestras de café procesado

Beneficio	Muestra	*Ocratoxina A (µg/kg)	*Aflatoxinas Totales (µg/kg)
Beneficio A	1	27,76 ± 0,57	ND
	2	33,79 ± 0,54	ND
Beneficio J	15	4,90 ± 0,15	ND
Beneficio N	19	ND	1,93 ± 0,06
Beneficio O	20	ND	1,73 ± 0,69
	21	37,73 ± 0,35	1,51 ± 0,40

*Promedio de 3 mediciones

Media ± SD

N.D.: no detectada.

peratura. Es un parámetro estrechamente ligado a la humedad del alimento, lo que permite determinar su capacidad de conservación, puesto que determina la posibilidad de crecimiento microbiano (26). Para la producción de Ocratoxinas, la a_w óptima es de 0,87-0,90, dependiendo de la temperatura (10); si hay una humedad excesiva ($a_w \geq 0,95$), prosperan hongos hidrofílicos de rápido crecimiento, así como las levaduras, que compiten por el sustrato y reprimen el crecimiento de los hongos productores de Ocratoxina A. Si hay condiciones de sequedad, actividad de agua inferior a 0,76, el hongo productor de micotoxinas no podrá desarrollarse (21). Los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* no se desarrollan en condiciones de humedad excesiva, como en las cerezas de café frescas, debido a la presencia de las especies antagónicas, hidrofílicas de rápido crecimiento, como es el caso de los hongos del género *Cladosporium* y *Mucor*, los cuales fueron aislados e identificados en 11 de las muestras de granos de café procesado. Además se ha reportado que la acción de bacterias y hongos, entre ellos especies de *Mucor sp.*, como son *Mucor ambigús*, *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*, modifican la estructura de la Aflatoxina B₁ (27).

Algunos autores (20,28) mencionan en sus estudios, que la determinación del contenido de humedad es una herramienta simple pero muy útil, como parámetro por considerar, para el almacenaje de los granos de café verde. Se considera un rango de contenido de agua óptimo para el almacenamiento, entre 8,0% y 12,5% (28), aunque otros autores mencionan que un contenido de humedad de hasta el 14,5% puede prevenir el crecimiento de hongos durante el almacenaje

(20). En cuanto a los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, se indica que estas especies de hongos requieren para su desarrollo una menor humedad relativa ambiental (70 - 90%) y contenido de agua en los granos de 15 - 20% (10).

En las muestras analizadas, se encontró un valor máximo de humedad de 38,6% que corresponde a la muestra del Beneficio O, distrito de Dolega, y un valor mínimo de humedad de 9,2%, que corresponde a la muestra del Beneficio I, distrito de Renacimiento. Nueve de las 21 muestras de café procesado presentaron porcentajes de humedad por encima de 12,5%, que es el valor máximo considerado como bueno para almacenar el café y evitar el crecimiento de hongos. Ninguna de las muestras presentó un porcentaje de humedad por debajo de 8,0%, que es el valor mínimo aceptado como bueno para almacenar el café. Sin embargo, solo una muestra del Beneficio A presentó contaminación con *Penicillium*. Este resultado sugiere que a pesar de que las muestras fueron almacenadas, en su gran mayoría, por más de un mes e incluso un año, las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) fueron aceptables, evitando el crecimiento de hongos productores de micotoxinas.

Se detectó Ocratoxina A solo en cuatro de las 21 muestras analizadas (Tabla 2). Estas muestras fueron colectadas en los beneficios A y J (Bugaba) y Beneficio O (Dolega). Las concentraciones de la Ocratoxina A se detectaron en el rango de 4,90-37,73 µg/kg. La muestra 21 mostró el contenido más alto de Ocratoxina A (37,73 µg/kg), lo que tiene mucha relación con el porcentaje de humedad, ya que esa misma muestra tuvo el porcentaje de humedad más alto de los granos de 38,61%. En el caso de la determinación de Aflatoxinas totales, de las 21 muestras analizadas, solo 3 tres presentaron niveles detectables de Aflatoxinas en un rango de 1,51- 1,93 µg/kg.

El bajo número de muestras que presentan micotoxinas indica que el manejo poscosecha del café, es apropiado. El alto riesgo de contaminación se da en frutos que han estado en contacto con el suelo, durante las operaciones de secado en los patios. La contaminación disminuye cuando el piso donde se realiza la operación de secado es cubierto con asfalto o cemento (29). En análisis de micotoxinas realizados a café en grano verde, café tostado molido y café soluble, los niveles de contaminación por OTA, fueron de 5,77 µg/kg, 1,00 µg/kg y 1,99 µg/kg, respectivamente, lle-

gándose a la conclusión de que el promedio de la concentración de OTA en café verde en granos es, al menos, seis veces más alta que en café tostado molido y tres veces más alta que en café soluble. Con ello queda demostrado que las diferentes condiciones térmicas aplicadas a las muestras para su procesamiento, reducen la concentración de OTA. En la práctica, el incremento o descenso en los niveles de micotoxinas en cualquier producto, es dependiente de las condiciones climáticas, almacenamiento y condiciones de procesamiento (15); por ejemplo, en la torrefacción del café, se puede lograr una disminución de Ocratoxina de 65 al 100% (30).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos del análisis de las condiciones del manejo poscosecha del café, en los beneficios de la provincia de Chiriquí, Panamá, podemos concluir que la mayoría de los beneficios realizan un procesamiento del café por vía húmeda; que secan el café en patios, guardioles y secadores columnares y hacen el almacenamiento en sacos de fibra recubiertos con plástico. Bajo estas condiciones de procesamiento y debido a la presencia de hongos antagonistas, como *Mucor* y *Cladosporium*, los cuales fueron identificados en el 81% de las muestras analizadas, se reduce la presencia de hongos productores de micotoxinas. Sólo tres de las 21 muestras presentaron concentraciones de OTA superiores al límite máximo permitido para café normado por la Unión Europea, que es de 5 µg/kg. Con esta investigación se demuestra el excelente manejo poscosecha del café de exportación de Panamá, lo cual asegura la disminución de los riesgos de contaminación por micotoxinas. Se espera en el futuro realizar análisis de micotoxinas en el café tostado y molido de venta en el mercado nacional, para confirmar si el proceso de tostado disminuye o elimina la presencia de micotoxinas en el café.

AGRADECIMIENTOS

Se expresa la gratitud a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), dentro del marco del Programa de Fortalecimiento de los Procesos de Investigación, Educación e Innovación Tecnológica, por el financiamiento otorgado para la

ejecución del proyecto IDR10-005. Asimismo, al Ing. Alexis Bonilla, del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), Región I de Chiriquí. De igual manera, a los propietarios, administradores y técnicos de los beneficios de café, por la información y muestras de café suministradas.

REFERENCIAS

1. FAO. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en alimentos y en las raciones en el año 2003, 2004.
2. Stegen G.v.d., Jorissen U., Pittet A., Saccon M., Steiner W., Vincenzi M., Winkler M., Zapp J., Schlatter C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Addit Contam* 1997; 14(3): 211-216.
3. Thirumala-Devi K, Mayo MA, Reddy G, Delfosse P, Reddy DVR. Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 5079-5082.
4. Bayman P., Baker JL, Doster, MA, Michailides TJ, Mahoney NE. 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Appl Environ Microb* 68(5): 2326-2329.
5. Larsen TO, Gareis M, Frisvad JC. Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common penicillia on cheese agar. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 6148-6152.
6. Pitt JJ, Taniwaki MH, Cole MB. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control* 2013; 32: 205-215.
7. O'Callaghan J, Dobson ADW. Molecular characterization of Ochratoxin A biosynthesis and producing fungi. *Adv Appl Microbiol* 2006; 58: 227-243.
8. Batista LR, Chalfoun SM, Silva CF, Cirillo M, Varga EA, Schwan RF. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control* 2009; 20: 784-790.
9. Vecchio A, Mineo V, Planeta D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control* 2012; 28: 220-223.
10. Tozlovanu M, Pfohl-Leskowicz A. Ochratoxin A in roasted coffee from french supermarkets and transfer in coffee beverages: comparison of analysis methods. *Toxins* 2010; 2: 1928-1942.
11. Zheng MZ, Richard JL, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 2006; 161: 261-273.
12. Carrillo L. *Aspergillus*. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad de Salta 2003; 4: 44-55.

13. Turner NW, Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta* 2009; 632:168-180.
14. Coronel MB, Marin S, Cano G, Ramos AJ, Sanchis V. Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. *Food Control* 2011; 22: 414-419.
15. Vanesa D, Ana P. Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control* 2013; 30: 675-678.
16. AOAC. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, 2005.
17. Barnett HL, Hunter, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. New York, Macmillan Publishing, 1987.
18. Helica Biosystems. Inc. Quantitative Assay for Ochratoxin A in coffee, cocoa and spices (Cat. No. 9610CH01COF-96). 2011. <http://www.helica.com/assets/OCHRATOXIN%20COFFEE%20ASSAY%20%2096%20copy.pdf>.
19. Helica Biosystems, Inc. Total Aflatoxin Assay_Low Matrix (Cat. No. 981AFLM01M-96). 2011. http://www.helica.com/assets/Total%20Aflatoxin96_v.02.pdf.
20. Bucheli P, Kanchanomai C, Meyer I, Pittet A. Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. *J Agric Food Chem* 2000; 51:1358-1362.
21. FAO. Enhancement of coffee quality through the prevention of mould formation. Final Technical Report. R. Clarke, J.M. Frank y J. Jackson ed., Roma, 2006.
22. Martins ML, Martins HM, Gimeno A. Incidence of microflora and ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Addit and Contam* 2003; 20(12): 1127-1131.
23. Batista LR, Chalfoun SM, Prado G, Schwan RF, Wheals A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica L.*). *Int. J. Food Microbiol.* 2003; 85: 293-300.
24. Silva CF; Schwan RF; Dias ES; Wheals AE. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of (*Coffea arabica L.*) in Brazil *Int J Food Microbiol* 2000; 60: 251-260.
25. Suarez-Quiroz M, Gonzales-Ríos O, Barel M, Guyot B, Schorr-Galindo S, Guiraud JP. Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. *Int J Food Microbiol* 2005; 103(3): 339-345.
26. Barkai-Golan R, Paster N. (Ed.). *Mycotoxins in fruits and vegetables*. San Diego, Academic Press, 2008.
27. Astoviza MB. y Socorrás-Suárez, M.M. Micotoxinas y cáncer. *Rev Cubana Invest Biomed* 2005; 24(1): 54-59.
28. Reh CT, Gerber A, Prodolliet J, Vuataz G. Water content determination in green coffee. Method comparison to study specificity and accuracy. *Food Chem* 2006; 96: 423-430.
29. Batista LR, Chalfoun SM, Silva CR, Cirillo M, Varga E., Schwan, R.F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica L.*) processed by dry and wet methods. *Food Control* 2009; 20: 784-790.
30. Codex Alimentarius. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de ocratoxina A en el café CAC/RCP 69-2009, 2009.

Recibido: 23-01-2014
 Aceptado: 16-05-2014

Capacidad antioxidante de subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

Ofelia Araceli López-Mejía, Aurelio López-Malo, Enrique Palou

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, México.

RESUMEN. Se evaluó la capacidad antioxidante (CA) en subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) de dos parcelas de cultivo, en función de tres métodos de extracción y dos disolventes, a tres concentraciones diferentes. En una primera etapa, se evaluó el efecto del método de extracción (homogeneización, ultrasonido de baja frecuencia y la combinación homogeneización-ultrasonido) y del disolvente de extracción (metanol o etanol, al 100%); en una segunda etapa, se evaluó el efecto de la concentración del disolvente de extracción (100%, 70% o 50%). La CA se determinó por inhibición del radical DPPH•, expresándola en mg Equivalentes de Trolox (ET)/g materia seca; los compuestos fenólicos totales (FT) se determinaron mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, expresándolos como Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/g materia seca. Los compuestos antioxidantes se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para la CA, no existe diferencia significativa ($p>0,05$) entre los métodos de extracción estudiados, mientras que sí la hay ($p<0,05$) entre disolventes (3,39 y 1,28 mg ET/g materia seca, con metanol y etanol, respectivamente). Para FT, no hay diferencia significativa ($p>0,05$) entre disolventes al usarlos diluidos, sólo al emplearlos al 100%; mientras que para CA sí hay efecto de la concentración del disolvente, obteniendo mayores valores de CA al utilizar los disolventes al 50% (21,34 y 21,82 mg ET/g materia seca, con metanol y etanol, respectivamente). El análisis cualitativo de los extractos mostró la presencia de escualeno y 2,5-bis (1,1-dimetiletil) fenol como los principales compuestos con capacidad antioxidante.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, *Amaranthus hypochondriacus*, subproductos de semillas de amaranto.

SUMMARY. Antioxidant capacity of byproducts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. The antioxidant capacity (CA) of byproducts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds from two harvest parcels as a function of three extraction methods and two solvents was evaluated. On a first stage the effect of extraction method (homogenization, low frequency ultrasound, or the combination homogenization-ultrasound) and extraction solvent (methanol or ethanol, 100%) were evaluated; on a second stage, the effect of extraction solvent concentration (100%, 70%, or 50%) was evaluated. CA was determined by DPPH• inhibition, which was expressed as mg Equivalents of Trolox (ET)/g dry matter (DM). Total Phenolic compounds (FT) were determined by means of the Folin-Ciocalteu assay and expressed as Equivalents of Gallic Acid (EGA)/g DM. Antioxidant compounds were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. For CA, there was not significant difference ($p>0,05$) among extraction methods, but there was significant difference ($p<0,05$) between solvents (3,39 and 1,28 mg ET/g DM, with methanol and ethanol, respectively). For FT, there was not significant difference ($p>0,05$) between solvents when they were diluted, but a significant difference ($p<0,05$) was observed when they were used at 100%. For CA, there was a significant ($p<0,05$) effect of solvent concentration, both studied solvents at 50% provided the best results (21,34 and 21,82 mg ET/g DM with methanol and ethanol, respectively). The qualitative analysis of the extracts exhibited the presence of squalene and 2,5-bis (1,1-dimethylethyl) phenol as the major compounds with antioxidant capacity.

Key words: Antioxidant capacity, *Amaranthus hypochondriacus*, amaranth byproducts.

INTRODUCCIÓN

Los materiales vegetales contienen gran diversidad de compuestos bioactivos, dentro de los cuales se encuentran los antioxidantes. Éstos han sido estudiados ampliamente en las últimas décadas debido a sus propiedades funcionales, por las cuales tienen aplicaciones en la salud, la industria cosmética y la industria alimen-

taria (1). La Norma Oficial Mexicana (NOM) 043-SSA2-2005 define a los antioxidantes como sustancias que previenen la oxidación y ayudan al mantenimiento de la integridad celular, inactivando los radicales libres que causan daño celular (2). Por otro lado, el *Codex Alimentarius* los define como aditivos alimentarios que prolongan la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro ocasionado por la oxidación (3). Dentro

de los principales antioxidantes presentes en los alimentos se encuentran las vitaminas C y E, los carotenoides, los compuestos fenólicos y los flavonoides.

El estudio de la capacidad antioxidante en materiales alimenticios, generalmente, involucra su extracción mediante el uso de disolventes tales como agua, etanol, metanol, acetato de etilo o hexano, entre otros (4). El metanol es reconocido como un eficiente agente de extracción, pero no es considerado seguro. En cambio, el etanol representa una alternativa de disolvente seguro en procesos de extracción para productos con fines alimenticios (5). Para la obtención de extractos antioxidantes, a partir de diferentes materiales vegetales, se aplican diversas técnicas dependiendo de las características del tejido vegetal que se somete a extracción y de los componentes que desean extraerse. Tales métodos comprenden extracción Soxhlet, agitación, homogeneización y ultrasonido de baja frecuencia, entre otros (6, 7). La naturaleza del disolvente, las condiciones del método, así como el tiempo de análisis requerido son factores que pueden afectar el resultado analítico debido a una degradación que pueden sufrir estos compuestos de interés (7).

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un cultivo de gran importancia en México, donde los principales estados productores son Puebla, Oaxaca, Querétaro, Morelos, Tlaxcala, Distrito Federal y Estado de México. Sus principales formas de consumo en México son, semillas reventadas o esponjadas, dulces denominados "alegrías", harina y botanas elaboradas con la semilla. El procesamiento del amaranto involucra inicialmente una limpieza, de la cual se genera un subproducto que contiene restos de flores, semillas vanas y cascarilla. Este material es considerado un subproducto que, por el momento, no tiene usos o aplicaciones específicos. Algunos estudios han reportado capacidad antioxidante in vitro en flores de *A. lividus* (8). Álvarez-Jubete *et al.* (9) reportan la presencia de polifenoles en semillas de *A. caudatus*. Otros estudios reportan compuestos fenólicos y antocianinas en semillas de *A. cruentus* (10). Sin embargo, las posibles propiedades funcionales de este material residual, proveniente del procesamiento de semilla, no han sido estudiadas con el fin de identificar sus usos potenciales. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos totales en el subproducto obtenido de la limpieza de semillas de amaranto, pertenecientes a

dos parcelas diferentes de cultivo, así como el efecto de tres métodos de extracción con dos disolventes, metanol y etanol, a tres diferentes concentraciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología consistió en evaluar tres **métodos de extracción**, homogeneización, ultrasonido de baja frecuencia o un método combinándolos homogeneización-ultrasonido, sobre la concentración de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos. Se llevaron a cabo extracciones con metanol o etanol como disolventes, en forma absoluta (100%) y diluida (70 o 50%) para determinar también el efecto de los factores disolvente y concentración de disolvente sobre la capacidad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos totales en los extractos.

Obtención de la muestra: El material, subproducto de la separación neumática de semillas a partir de las panojas de amaranto corresponde a la cosecha del primer semestre de 2012 de dos parcelas denominadas Correbarranca I y Correbarranca II, cuya única diferencia es la locación, pero ambas están ubicadas en el municipio de Tehuacán y fue proporcionado por Alternativas de Participación Social A. C. de Tehuacán, Puebla, México. El material (2 kg) se empacó en bolsas de polietileno, cerradas herméticamente y se conservó a -18°C hasta su análisis.

Caracterización de las muestras: Las muestras (aproximadamente 250 g) se sometieron a una disminución de tamaño en un molino para especias (Krupps®, México D.F., México) y se pasaron por un tamiz (Mont-Inox, Cd. de México, D.F., México) con tamaño de orificio 0,85 mm. La caracterización de las muestras consistió en realizar los análisis de la composición proximal que incluyen la determinación del contenido de humedad (934.01), cenizas (923.03), grasa (extracto etéreo) (920.39), proteína (960.52) y fibra cruda (920.86), siguiendo los métodos propuestos por la AOAC (11). Los carbohidratos totales se calcularon por diferencia.

Extracción: Previo a la extracción, las muestras (250 g) previamente molidas se secaron en estufa de vacío (Cole Parmer®, Chicago, Illinois, EE.UU.) a 50°C y 15 in Hg de vacío, durante 4 h. La extracción se llevó a cabo por tres diferentes métodos: homogeneización (5 min), ultrasonido de baja frecuencia (10 min), o combinándolos, aplicando primeramente 5

min de homogeneización e inmediatamente después 10 min de ultrasonido. Como disolventes de extracción se utilizaron etanol (Química Meyer, Cd. de México, D. F., México) o metanol (Omnichem, Puebla, Puebla, México), al 100, 70 o 50%. Las extracciones con cada método se realizaron por triplicado como se indica a continuación.

Homogeneización: Se mezclaron 2 g de muestra con 30 mL de disolvente (proporción 1:15) y se sometieron a un proceso de homogeneización durante 5 min con un equipo Ika Ultraturrax®T18 basic (Washington, DCEE.UU.). El extracto se centrifugó (centrífuga, Marathon® 21K/12, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.) a 4°C, durante 5 min a 12000 rpm. El sobrenadante se conservó en frasco ámbar de vidrio a -18°C hasta su análisis.

Ultrasonido de baja frecuencia: Se mezclaron 2 g de muestra con 30 mL de disolvente (proporción 1:15) y se sometieron a un tratamiento de ultrasonido con una sonda ultrasónica de 13 mm (Ultrasonic processor, Cole Parmer, EE. UU.), a 20 kHz de frecuencia, 500 Watts potencia, amplitud de 60%, por un lapso de 10 min en un baño de agua a 20°C. Los extractos, se centrifugaron y conservaron de la misma forma que los extractos obtenidos con el método de homogeneización.

Homogeneización-Ultrasonido: Se mezclaron 2 g de muestra con 30 mL de disolvente (proporción 1:15) y se sometieron a un proceso de homogeneización durante 5 min de la misma manera descrita anteriormente. Después de la homogeneización, se sometieron a un tratamiento de ultrasonido bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad durante un lapso de 10 min a una temperatura de 20°C. Los extractos se centrifugaron y conservaron de la misma forma que los extractos obtenidos con los métodos anteriores.

Caracterización de extractos: La caracterización de los extractos incluyó la determinación de la concentración de compuesto fenólicos totales y la capacidad antioxidante así como la identificación cualitativa de los compuestos antioxidantes presentes.

Capacidad antioxidante (CA): La determinación de la CA se basa en la formación del radical DPPH• y su inhibición por compuestos antioxidantes (12). Se elaboró una curva estándar, haciendo reaccionar alícuotas de 3,9 mL de solución de 2, 2-difenil-1-picrilhidracilo (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.), DPPH• (3,94 mg/100 mL de metanol al 80%) y alícuotas de 0,1 mL de soluciones del antioxidante Tro-

lox (Aldrich, Darmstadt, Alemania), en un intervalo de 0,02 a 0,32 mg de Trolox en metanol al 80%, alcanzando un volumen total de 4 mL. El blanco para las mediciones fue metanol al 80%. Los tubos conteniendo estas mezclas se agitaron y se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente en la obscuridad. Transcurrido este lapso, se midió la absorbancia (ABS) a 515 nm en espectrofotómetro (UNICO 2800H, UV/VIS, EE.UU.). La curva estándar se obtuvo graficando el porcentaje de inhibición del radical DPPH• ($\% \text{ inhibición} = [\text{ABS}_{\text{inicial}} - \text{ABS}_{\text{final}}] / [\text{ABS}_{\text{inicial}}]$) en función de la concentración de Trolox, en mg equivalentes de Trolox (mg ET). Se considera ABSinicial a la absorbancia medida del reactivo de DPPH• preparado para la reacción, y ABSfinal, a la absorbancia del DPPH•, después de la reacción con el antioxidante. La CA en los extractos se obtuvo haciendo reaccionar alícuotas de 0,1 mL de extracto con 3,9 mL solución de DPPH• de la misma manera que para los estándares. Se calculó el porcentaje inhibición y la CA se calculó aplicando la ecuación de regresión obtenida de la curva estándar. La capacidad antioxidante en los extractos se expresó como mg EAG/g de muestra seca.

Compuestos Fenólicos Totales (FT): La determinación de FT se fundamenta en la reducción que generan los compuestos fenólicos en el molibdeno contenido en el reactivo de Folin-Ciocalteu (13). La determinación consistió en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemania), haciendo reaccionar 0,1 mL del extracto, con 0,2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, adicionando 2 mL de agua destilada, la mezcla se dejó reaccionar por 3 min y se le adicionó 1 mL de solución de Na₂CO₃ (RBM, Puebla, Puebla México) al 20%; después de 60 min en la obscuridad se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm, en un espectrofotómetro (UNICO, 2800H, UV/VIS, EE.UU.). La curva estándar se realizó haciendo reaccionar alícuotas de 2,1 mL de soluciones de ácido gálico en un intervalo de 0,00157 a 0,01570 mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) y 0,2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reaccionar por 3 min, posteriormente se adicionó 1 mL de solución de Na₂CO₃ al 20%, con lo que se alcanzó un volumen final de 3,3 mL. Después de 60 min de incubación se midió la absorbancia a 765 nm. El blanco se preparó mezclando una alícuota de 2,1 mL de agua con 0,2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1 mL de

Na₂CO₃. La concentración de compuestos fenólicos totales en el extracto se calculó a partir de la curva estándar y se expresó como mg EAG/g muestra seca.

Determinación cualitativa de compuestos antioxidantes: El análisis de componentes se realizó mediante la inyección de 1 µL de cada uno de los extractos en un equipo de cromatografía de gases (Agilent Technologies 6850, Santa Clara, California, EE.UU.) con detector de masas (5975 C VL MSD triple axis, con temperatura de trabajo de 270°C). Las condiciones para el análisis fueron: inyección en modo split, usando helio como gas transportador (flujo de 1,1 mL/min), en una columna (Agilent HP-5MS -5% metil fenil siloxano-) de 30 m X 250 µm X 0,25 µm. La determinación se realizó manteniendo inicialmente la temperatura a 60°C por 10 min, para después elevar la temperatura a razón de 5°C/min hasta alcanzar 240°C; esta temperatura se mantuvo durante 10 min. El tiempo total de análisis fue de 56 min. La identificación de los componentes antioxidantes se realizó mediante el espectro de masas, el índice de retención y la biblioteca del software del equipo (*National Institute of Standards and Technology, NIST, Mass Spectral Library*).

Evaluación del efecto del método de extracción, del tipo y concentración del disolvente: Todas las de-

terminaciones son el resultado de la media desviación estándar de tres réplicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($p < 0,05$), con el software Minitab® (versión 15, EE.UU.), para determinar diferencias significativas en la capacidad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos totales entre los métodos de extracción aplicados, entre los disolventes de extracción y sus diluciones, así como entre la procedencia de las muestras.

RESULTADOS

La Tabla 1 presenta los resultados del análisis proximal que se realizó a las muestras de los subproductos de limpieza de la semilla de amaranto provenientes de las dos parcelas, se determinaron mayores contenidos de cenizas, proteína y fibra cruda en la muestra perteneciente a la parcela Correbarranca II, lo que consecuentemente se reflejó en una disminución en su contenido de carbohidratos totales.

La Tabla 2 muestra los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos, evaluados en la primera etapa (solventes al 100%). Al comparar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las muestras de cada parcela por los distintos métodos de extracción

TABLA 1 Análisis proximal (g/ 100 g de muestra húmeda) de los subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) provenientes de dos parcelas.

Parcela	Humedad	Cenizas	Grasa (extracto etéreo)	Proteína	Fibra cruda	Carbohidratos Totales*
Correbarranca I	8,09 ± 0,05 ^a	10,63 ± 0,36 ^a	3,60 ± 0,21 ^a	6,33 ± 0,27 ^a	16,83 ± 0,27 ^a	53,71
Correbarranca II	8,28 ± 1,83 ^a	11,44 ± 0,19 ^b	2,45 ± 0,42 ^b	9,28 ± 0,20 ^b	20,03 ± 0,43 ^b	47,95

* Calculados por diferencia

Los valores reportados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre parcelas.

TABLA 2 Efecto del método de extracción, disolvente de extracción y parcela de cultivo (Correbarranca I o II) sobre la capacidad antioxidante de los extractos de subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) utilizando disolventes absolutos.

Método	Disolvente	Capacidad Antioxidante (mg ET/g muestra seca)	
		Correbarranca I	Correbarranca II
Homogeneización	Metanol	3,39 ± 0,69 ^{a,A}	2,19 ± 0,46 ^{a,B}
	Etanol	0,95 ± 0,07 ^{b,A}	0,28 ± 0,06 ^{b,B}
Ultrasonido	Metanol	2,96 ± 0,74 ^{a,A}	2,10 ± 0,15 ^{a,B}
	Etanol	1,28 ± 0,15 ^{c,A}	0,85 ± 0,06 ^{c,B}
Homogeneización-ultrasonido	Metanol	3,29 ± 0,00 ^{a,A}	2,57 ± 0,07 ^{a,B}
	Etanol	1,16 ± 0,25 ^{bc,A}	0,77 ± 0,16 ^{bc,B}

Los valores reportados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en valores correspondientes a la misma columna.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en valores correspondientes al mismo renglón.

aplicados se observó que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$), por lo que es indistinto utilizar como método de extracción homogeneización, ultrasonido de baja frecuencia o su combinación, cuando se utiliza metanol como disolvente. Sin embargo, si se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante entre los extractos obtenidos de los subproductos de limpieza de la semilla de amaranto provenientes de las distintas parcelas; el extracto del material proveniente de la parcela Correbarranca I posee mayor capacidad antioxidante (para los tres métodos de extracción estudiados). También se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la capacidad

antioxidante de los extractos obtenidos con los dos disolventes grado absoluto, siendo el metanol el disolvente que logró extraer en mayor cantidad componentes con capacidad antioxidante.

Con respecto al efecto de la concentración del disolvente (absolutos y diluidos), se optó como método de extracción la homogeneización dada su facilidad, se observó (Tabla 3) diferencia significativa ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante entre disolventes cuando se usaron en su forma absoluta. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la capacidad antioxidante del extracto, entre disolventes, cuando se utilizaron en forma diluida; pero sí se observaron di-

TABLA 3 Efecto de la concentración de disolvente sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales de los extractos de subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) provenientes de dos parcelas.

Disolvente		Parcela			
		Correbarranca I		Correbarranca II	
		Capacidad antioxidante (mg ET/g materia seca)	Fenólicos Totales (mg EAG/g materia seca)	Capacidad antioxidante (mg ET/g materia seca)	Fenólicos Totales (mg EAG/g materia seca)
Etanol	100%	0,95 ± 0,07 ^a	0,18 ± 0,03 ^a	0,28 ± 0,06 ^a	0,12 ± 0,02 ^a
	70%	17,61 ± 2,50 ^b	1,48 ± 0,07 ^b	10,55 ± 1,02 ^b	1,01 ± 0,04 ^b
	50%	21,82 ± 0,69 ^c	1,75 ± 0,05 ^c	12,70 ± 2,15 ^c	1,28 ± 0,05 ^c
Metanol	100%	3,39 ± 0,69 ^d	0,56 ± 0,00 ^d	2,19 ± 0,46 ^d	0,37 ± 0,01 ^d
	70%	17,66 ± 0,96 ^b	1,46 ± 0,06 ^b	10,41 ± 0,93 ^b	1,02 ± 0,02 ^b
	50%	21,34 ± 1,11 ^c	1,71 ± 0,14 ^c	13,58 ± 1,27 ^c	1,21 ± 0,06 ^c

Los valores reportados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en valores correspondientes a la misma columna.

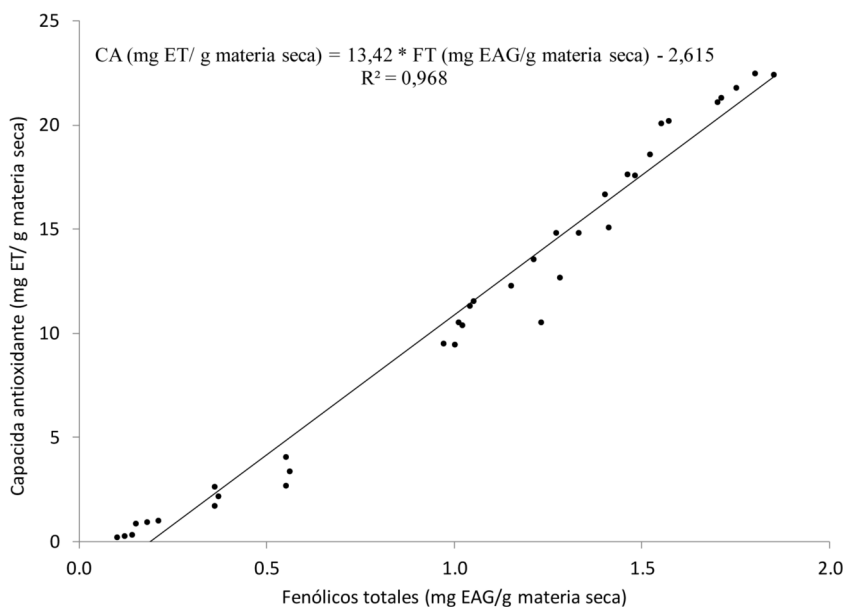


FIGURA 1
Correlación entre la capacidad antioxidante (CA) y el contenido de fenólicos totales (FT) en extractos de subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

ferencias significativas ($p < 0,05$) entre estas dos diluciones (70 o 50%) pertenecientes a un mismo disolvente, siendo los extractos de mayor capacidad antioxidante, los correspondientes a la concentración del 50%. Los extractos de los subproductos de limpieza de la semilla de amaranto provenientes de la parcela Correbarranca I al utilizar los disolvente al 50% mostraron los valores más altos de capacidad antioxidante ($21,82 \pm 0,69$ mg ET/g materia seca, con etanol y $21,34 \pm 1,11$ mg ET/g materia seca, con metanol). Los resultados de la concentración de compuestos fenólicos totales (Tabla 3) se comportan de la misma forma que la capacidad antioxidante, siendo mayores los valores obtenidos con disolventes al 50%, correspondientes a la parcela Correbarranca I ($1,75 \pm 0,05$ mg EAG/g materia seca, con etanol y $1,71 \pm 0,14$ mg EAG/g materia seca, con metanol).

Se observaron resultados más altos de capacidad antioxidante y fenólicos totales, para ambas parcelas en el caso de los extractos obtenidos con metanol y etanol, al 50%, seguido por las diluciones al 70% y, finalmente los resultados más bajos se obtuvieron en extractos obtenidos con los disolventes en grado absoluto (al 100%). Al comparar los extractos analizados, se observa una relación lineal entre la capacidad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos totales de los extractos (Figura 1).

Los principales componentes antioxidantes, encontrados en todos los extractos fueron 2-metoxi-4-vinil fenol, escualeno y 2,5-bis (1,1-dimetiletil) fenol.

DISCUSIÓN

La similitud en contenido de fibra cruda que tienen las muestras provenientes de ambas parcelas (16,83 g/100g, para Correbarranca I y 20,03 g/100g, para Correbarranca II) con respecto al salvado de avena (15,4 g/100 g) y al salvado de arroz (21 g/100 g) (14), importantes comercialmente en la actualidad, puede representar una oportunidad potencial de aplicación de este material de desecho (subproductos de limpieza de la semilla de amaranto) en productos para la alimentación animal, permitiendo incrementar su contenido de fibra (aun cuando el contenido de fibra cruda subestima el contenido de fibra dietética); pues a este material de desecho, en general, no se le da uso.

De acuerdo con los resultados obtenidos, relacionados a la capacidad antioxidante y a los compuestos

fenólicos totales de extractos obtenidos con disolventes en grado absoluto, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tres métodos de extracción estudiados. En un trabajo comparativo de métodos de extracción para determinar compuestos fenólicos en semillas de uva, se probaron los métodos de maceración (convencional) y de extracción asistida por ultrasonido (rápido) y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la concentración de compuestos fenólicos (15). Una gran ventaja de los métodos rápidos, como los evaluados en este trabajo (homogeneización o ultrasonido), es el corto tiempo requerido para la extracción. El tiempo es un factor que influencia la recuperación de compuestos antioxidantes, y se llega a reflejar en la degradación por oxidación (16). Por tal motivo, en la segunda parte del trabajo, cuando se compararon los dos disolventes en grados absolutos y diluidos, se utilizó el método de homogeneización, pues en éste se requiere menor tiempo para la extracción.

Por otro lado, sí se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los extractos de los subproductos procedentes de diferente parcela; esto se puede deber a la presencia de fragmentos de flores, con coloraciones rojizas, que se percibe en mucho mayor cantidad en las muestras de la parcela Correbarranca I, respecto a las provenientes de la parcela Correbarranca II; tal coloración se debe al contenido de derivados de antocianinas en las flores de amaranto (17), lo que puede estar incrementando la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de los subproductos provenientes de la parcela Correbarranca I. La diferencia en la cantidad de fragmentos de flores en las muestras analizadas se atribuye a diferencias en el método de recolección de la semilla.

Al analizar la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales de extractos de materiales vegetales, se debe considerar que varios factores pueden afectar el resultado, como son el tipo y variedad de cultivo, el tipo y tiempo de almacenamiento del material a analizar y el método de extracción utilizado, entre muchos otros (18). La importancia de los resultados obtenidos en este trabajo radica en la poca información existente respecto a propiedades antioxidantes de este material de desecho (subproductos de limpieza de la semilla de amaranto).

De los disolventes evaluados, el metanol fue el que logró extraer mayor cantidad de componentes antio-

xidantes, esto se debe a que este disolvente tiene la capacidad de causar daño al tejido a nivel de pared celular, permitiendo así la salida de componentes intracelulares (19). Se ha reportado que el metanol es un disolvente altamente efectivo en la extracción, esto ha sido probado en diversos estudios donde se compara con otros disolventes como agua, acetona y/o acetato de etilo (1, 20). Heşet *et al.* (21), obtuvieron una mayor extracción de compuestos fenólicos antioxidantes, usando metanol absoluto, cuando trabajaron con alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*). El hecho de que ambos disolventes, metanol y etanol, diluidos con agua hayan logrado mayor extracción de compuestos con capacidad antioxidante (Tabla 3) que los disolventes absolutos, indica que los componentes antioxidantes mayoritarios son fenólicos, mismos que poseen una afinidad por medios acuosos combinados con disolventes polares, por ello a mayor dilución, mayor capacidad antioxidante detectada y mayor cantidad de compuestos fenólicos totales. Sultana *et al.* (22) también determinaron una mayor actividad antioxidante y contenido de fenólicos en extractos de plantas medicinales, cuando utilizaron metanol y etanol diluidos con agua (80%) que cuando usaron los disolventes en grado absoluto. Otra investigación realizada con alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), reporta mayor contenido de fenólicos totales cuando la extracción se realizó con etanol al 50%, incluso mayor que la obtenida con el disolvente absoluto o con agua (23). De lo anterior se deduce que los disolventes diluidos al 50% favorecen la disolución de los componentes con polaridad afín a la mezcla agua:etanol o agua: metanol (50:50). Diversos estudios han encontrado en el agua una menor capacidad de extracción de compuestos antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos (20). La capacidad antioxidante determinada en un material depende en gran medida de la naturaleza y polaridad del disolvente de extracción, esto debido a la interacción existente de los compuestos antioxidantes con otros componentes; por ejemplo, la interacción de compuestos fenólicos asociados a carbohidratos o proteínas, pueden afectar su solubilidad en disolventes determinados (1, 7). Existe una tendencia entre los resultados de la concentración de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con las diferentes concentraciones de los disolventes, indicando una relación proporcional-

mente directa (Figura 1). Lo anterior indica que la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos. El potencial antioxidante de las muestras de subproductos de limpieza del amaranto estudiadas es resultado de los fragmentos de flores y de la cascarilla de la semilla, por la función protectora que esta cascarilla desempeña, en este caso particular, en materiales con alto contenido de lípidos, como lo es la semilla de amaranto (1). Goristein *et al.* (24) reportaron $154 \pm 15,7$ mg EAG/100 g materia seca (correspondientes a $1,54 \pm 0,15$ mg EAG/g materia seca) en semilla integral de *A. hypochondriacus*, obtenido con solución acuosa de metanol al 50%. En el presente estudio, debido a la presencia mayoritaria de cascarilla y flores en el material analizado, se encontró una cantidad de $1,70 \pm 0,14$ mg EAG/g materia seca. Se detectó así mismo un contenido importante de compuestos fenólicos totales, lo cual indica que este material (subproductos de limpieza de la semilla de amaranto) sería potencialmente utilizable en productos de alimentación humana, adicionándola en productos como harinas integrales, frituras elaboradas a base de harina de amaranto, así como para alimentación animal. Dentro de los componentes bioactivos encontrados en los extractos, se encuentra el escualeno, que es un compuesto isoprenoide similar en su estructura al beta-caroteno, este compuesto no es muy susceptible a la peroxidación y llega a funcionar como protector a la exposición de radiación UV y radiación ionizante (25). La presencia de escualeno en estos extractos puede deberse a que las muestras analizadas contienen fragmentos de semillas. El 2,5-bis (1,1-dimetil) fenol, tiene una estructura relacionada a los antioxidantes sintéticos BHA y BHT, por lo que tendría aplicación potencial como antioxidante natural.

CONCLUSIONES

El método de homogeneización es una alternativa interesante para ser utilizada en la extracción de componentes antioxidantes ya que genera tiempos de extracción cortos. Los disolventes diluidos (50%), tanto metanol como etanol, son más eficientes en la extracción de componentes antioxidantes que los componentes absolutos, lo que indica que los componentes antioxidantes, del material residual analizado, son en su mayoría de carácter polar. El material residual, pro-

veniente de la limpieza de semilla de amaranto, puede tener usos potenciales como fuente de antioxidantes para la formulación de alimentos funcionales o alimentos susceptibles a la oxidación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a *Alternativas y Procesos de Participación Social A. C.* por el material de estudio, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México por el apoyo financiero al proyecto titulado: “Extracción, Caracterización y Funcionalidad de Compuestos de Origen Vegetal Obtenidos de Materiales Mexicanos Empleados Como Condimentos. Obtención de Agentes Antimicrobianos, Antioxidantes e Ingredientes Funcionales”. O.A. López-Mejía agradece el apoyo para la realización de sus estudios doctorales al CONACyT y a la Universidad de las Américas Puebla, México.

REFERENCIAS

- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sineiro J., Domínguez H., Nuñez M.J. y Parajó J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001; 72:145-171.
- DGN. Catálogo de Normas. Dirección General de Normas. Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, Servicios Básicos de Salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. México; 2005. Disponible: <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/inicio>. Consultado: 15/01/11.
- Codex Alimentarius. Normas oficiales del Codex. Nombres genéricos y sistema internacional de numeración de aditivos alimentarios, CAC/GL 36-1989; 2010. Disponible: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=7. Consultado: 23/01/2011.
- Singh R., Chidambara K., Jayaprakasha G. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Agr Food Chem.* 2002; 50: 81-86.
- Velasco R.J., Villada H.S., Carrera J.E. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Inf Tecnol.* 2007; 18(1):53-65.
- Liu G., Xu X., Hao Q., Gao Y. Supercritical CO₂ extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology. *LWT-Food Sci Technol.* 2009; 42:1491-1495.
- Ajila C.M., Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Godbout S., Valero J.R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit Rev Biotechnol.* 2011; 31(3): 227-249
- Ozsoy N., Yilmaz T., Kurt O., Can A., Yanardag R. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chem.* 2009; 116:867-872.
- Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.* 2010; 119,770-778.
- Paško P., Barton H., Zagrodzki P., Gorinstein S., Fołta M., Zachwieja Z. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chem.* 2009; 115:994-998.
- AOAC, Official Methods of Analysis (17th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. 2000. Gaithersburg, Madison, EUA.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1995; 28:25-30.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 1999; 299:152-178.
- USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. United States Department of Agriculture. 2013; disponible: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>, Consultada: 30/04/2013.
- Da Porto C., Porreto E., Decorti, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem.* 2013; 20:1076-1080.
- Dai J., Mumper R. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010; 15:7313-7352. doi:10.3390/molecules15107313.
- Mujica-Sánchez A., Berti M. El cultivo del Amaranto (*Amaranthus spp.*): producción, mejoramiento genético y utilización. 1997; FAO, Oficina regional para América Latina y el Caribe.
- Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 2006; 17:505-512
- Arranz M.S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Tesis Doctoral. 2010; Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Madrid, España.
- Kothari V., Gupta A., Naranigwal M. Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and bacterial compounds from plant seeds. *J Nat Re-*

- medies. 2012; 12(2):162-173.
21. Heś M., Góreck D., Dziedzic K. Antioxidant properties of extracts from buckwheat byproducts. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2012; 11(12):167-174.
 22. Sultana B., Anwar F., Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules.* 2009; 14: 2167-2180; doi:103390/molecules14062167.
 23. Inglett G., Chen D., Berhow M., Lee S. Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chem.* 2011; 125:923–929.
 24. Gorinstein S., Medina-Vargas O.J., Jaramillo N.O., Arnao-Salas I., Martinez-Ayala A.L., Arancibia-Avila P., Toledo F., Katrich E., Trakhtenberg S. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Eur Food Res Technol.* 2007; 225:321–328.
 25. Rodas B., Bressani R. Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto. *Arch Latinoam Nutr.* 2009. 59(1):82-87.

Recibido: 05-11-2013

Aceptado: 28-03-2014

Folates retention in brassica vegetables consumed in Brazil after different cooking methods

Ceres M. Della Lucia, Elizangela Rodrigues Da Silva Mota, Tatiana Aguiar Montini, Sônia M. R. Ribeiro, José Benício P. Chaves, Helena M. Pinheiro-Sant'Ana

Department of Pharmacy and Nutrition. Alto Universitário s/n, Guararema. Alegre-ES. Department of Nutrition and Health. Department of Food Technology. Universidade Federal de Viçosa-Viçosa, MG. Brazil.

SUMMARY. The present study aimed to determine the effects of different traditional cooking methods on folate (tetrahydrofolate - THF, 5-methyltetrahydrofolate - 5-MTHF and 5-formyltetrahydrofolate - 5-FTHF) retention in leafy vegetables. The analysis of folates was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC), with detection by fluorescence, using gradient elution, mobile phase of acetonitrile and phosphate buffer solution. The retention of isomers in vegetables after cooking ranged from 17.0 % to 87.2 % for THF, 53.4 – 94.1% for 5-MTHF and 39.0 – 107.9% for 5-FTHF. The retention of folates depended on the food matrix, the kind of isomer, and the cooking methods used. It is recommended that one should have more control over the choices for methods and time of cooking and the amount of water used at home and at foodservice as well.

Key words: Cooking techniques, stability, tetrahydrofolate, 5-methyltetrahydrofolate, 5-formyltetrahydrofolate.

RESUMEN. Retención de folatos en hortalizas consumidas en Brasil después de diferentes métodos de cocción. El presente estudio tuvo como objetivo determinar los efectos de los diferentes métodos de cocción tradicionales sobre la retención de folatos (tetrahidrofolato - THF, 5-metiltetrahidrofolato - 5-MTHF y 5-formiltetrahidrofolato - 5 FTHF) en hortalizas. El análisis de folatos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), con detección por fluorescencia, usando elución en gradiente, fase móvil de acetonitrilo y solución tampón de fosfato. La retención de los isómeros en las hortalizas después de la cocción varió de 17,0% a 87,2% para THF, 53,4 a 94,1% para 5-MTHF y de 39,0 a 107,9% para 5-FTHF. La retención de folatos dependió de la matriz del alimento, el tipo de isómero, y los métodos de cocción utilizados. Se recomienda que uno debe tener más control sobre las opciones de métodos y tiempo de cocción y la cantidad de agua utilizada en el hogar y también en los servicios de alimentación. **Palabras clave:** Técnicas de cocción, estabilidad, tetrahidrofolato, 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato.

INTRODUCTION

Folates have received great attention due to their effect on health, especially on the reduction in the risks of neural tube defects, in the prevention of cardiovascular diseases and certain kinds of cancer (1).

Folates of natural occurrence are found in foods in a variety of ways. The most commonly detected in foods and leafy vegetables are the isomers 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), tetrahydrofolate (THF) and 5-formyltetrahydrofolate (5-FTHF) (2).

The folate synthesis is only performed by microorganisms and higher plants. Therefore, it is an essential nutrient for mammals (3). Vegetables are considered the main natural sources of folates in human diet (4).

The loss of folates may be caused by environmental factors, such as pH, oxygen, antioxidants,

light, acids, alkalis, concentrations of metallic ions, cooking duration and methods, quantity of water used, besides the food's own characteristics (5). Folate losses during the cooking process mainly occur by leaching, since folates have hydrosoluble characteristics, and by thermal degradation (6). Other factors, such as environmental conditions (season of the year, climate, and geographical and geological conditions), may affect the levels of folates in vegetables (4).

It is estimated that approximately 50% of the initial concentration of folates in foods is lost during the culinary processes (1). Some results reported that steam cooking and frying may cause losses of up to 90% in the initial concentration (7). According to the same author, vegetables may lose about 70% of their concentration of folates after being boiled for 8 minutes, and most of the losses occurs by dissolution in the boiling water. There are very few specific studies which evaluate the impact of different

cooking methods on the concentration of folates in foods prepared both at home and at foodservices (1).

Among all the vitamins, folate belongs to one of the least studied compound groups, regarding the concentration in raw foods, as well as the stability throughout preparation. Particularly in Brazil, there is a great need for researches in this area, because there is no information available about the concentrations of folates in food composition tables. In fact, the methodology for the analysis of folates in foods requires complex procedures and standards poorly available in the world market.

The High Performance Liquid chromatography (HPLC) was used in the present work for the analysis of folates (THF, 5-MTHF and 5-FTHF) in vegetables highly consumed in Brazil (kale, spinach, mustard, florets and leaves of broccoli). Since these vegetables are offered almost all year long, the analysis of folates was also carried out in different seasons, considering the scarcity of information from previous works. Besides that, we compared the effects on folate stability of different cooking methods commonly used for vegetables in Brazil. The amounts of vegetables used in the preparations were based on those used in households.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and other materials

Acetonitrile HPLC degree (Tedia, USA) and ultra-pure water produced in Milli-Q® system (Millipore, USA) were used for the analysis of folates. Reagents with analytical grade used were: Anhydrous Monobasic Sodium Phosphate (Synth, Brazil), ascorbic acid (Vetec, Brazil), 2-mercaptoethanol (Vetec, Brazil), phosphoric acid (Proquímios, Brazil), sodium acetate (Chemco, Brazil) and sodium chloride (Vetec, Brazil).

A column was prepared to purify the extracts, with a stationary phase of Q-Sepharose (Pharmacia, USA) in 20% of ethanol 70%, using disposable plastic syringe for support, and flux established with peristaltic pump (Pharmacia Biotech).

The extracts were filtered with Inlab paper filter with a diameter of 9 cm. Before the analysis by HPLC, the extracts and standard solutions were filtered in HV Millex membrane filters, with 0.45 µm of porosity (Millipore, Brazil).

Standards and analytical curves

The standards of (6S)-5,6,7,8-sodium tetrahydro-

folate (THF), (6S)-5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate (5-MTHF) and (6S)-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate (5-FTHF) were kindly provided by Merck-Eprova (Switzerland) and maintained at -18°C before used.

The stock solution of the folate standards (200 µg/mL) and the solutions with increasing concentrations were prepared in an extracting solution (phosphate buffer solution 0.1 M, pH 6.0, containing 1% ascorbic acid, and 0.1% 2-mercaptoethanol).

The real concentration of the standard solution was verified by spectrophotometry and altered according to the following equation:

$$A = E \times C \times L$$

In which:

A = Maximum absorbance (read at 297 nm for THF, at 290 nm for 5-MTHF and at 285 nm for 5-FTHF, in phosphate buffer solution 0.1 M, pH 2.0) (8);

E = Molar absorption coefficient (for THF, 27; for 5-MTHF, 32 and for 5-FTHF, 31.5) (9);

C = Molar Concentration;

L = Width of the tray (1 cm).

The construction of the analytical curves of the folate isomers (THF, 5-MTHF and 5-FTHF) was carried out according to the concentration of the components in the vegetables. For each of the isomers six increasing concentrations of standard solutions were injected, where for THF, 5-MTHF and 5-FTHF these concentrations ranged from 0.0095 and 0.3821 µg/mL, 0.2432 and 9.7300 µg/mL, and 0.0490 and 0.9800 µg/mL, respectively.

Collection and preparation of the vegetables

The following vegetables were used: kale (*Brassica oleracea L.*), mustard (*Sinapsis arvensis*), spinach (*Spinacia oleracea L.*) and broccoli (*Brassica oleracea Italica* group) (florets and leaves). These vegetables were chosen due to their large consumption and availability and because they are considered important food sources of folate (7). Around 1 to 2 kg of each vegetable were collected.

The vegetables were randomly collected during the winter and spring and packed in plastic bags. The analyses of the vegetables were carried out in, at most, 48h after the collection. Four collections happened in each season evaluated, and each repetition was characterized by a weekly collection.

In the laboratory, the non-edible parts (stalks and damaged leaves) were removed, the vegetables were

washed in running water and the excess was removed with paper towel and prepared as explained below.

It was employed the quartering method for the leaves of kale and mustard, and the portions diagonally disposed were grouped. One part was analyzed raw and another was analyzed after being manually sliced with a knife (slices of approximately 0.5 cm thick) (sliced kale and mustard). The kale was also analyzed on a manually torn manner. After the pre-preparation, the vegetables were stir fried. For each 100 g portion of vegetable, 8 mL of soybean oil were used (1 tablespoon). The time of cooking was 2 minutes.

The leaves of broccoli and spinach were divided in two parts, one was analyzed raw, and the other after being stir fried. For each portion of 100 g of vegetable, 8 mL of soybean oil were used and the time of cooking was 2 min.

The florets of broccoli were divided into three parts; one of them was analyzed raw, the other was analyzed after being steam-boiled, in a regular pan, for 6 min, and the third part, after being boiled, also during 6 minutes (enough quantity of water to cover the vegetables: 100 g of vegetables for each 1000 mL of water) (10).

The quantities of vegetables used for cooking were based on those used in household preparation.

Soon after being cooked, all the vegetables were blended in a food processor for a complete homogenization, and were kept in a regular refrigerator before analysis.

To evaluate stability, the folate concentration retention percentage in the vegetables was reached after using different cooking methods, taking into account the weight changes that occurred during the process. For such, it was used the formula of the true or real retention (% TR) (11), as described below:

$$\% \text{ TR} = \frac{F_{\text{cooked}} (\mu\text{g}) \times Q_{\text{cooked}} (\text{g})}{F_{\text{raw}} (\mu\text{g}) \times Q_{\text{raw}} (\text{g})} \times 100$$

In which:

F_{cooked} = folate concentration in the cooked vegetable

F_{raw} = folate concentration in the raw vegetable

Q_{cooked} = quantity of cooked vegetable

Q_{raw} = quantity of raw vegetable

Acquisition of extracts and analysis of folate

During the steps of extraction and analysis, the ve-

getables and the extracts were protected against solar and artificial light, with the use of amber glass, aluminum foil and blackout drapes, and were protected against environmental oxygen with the use of lids and with nitrogen gas in glasses.

Folate extraction

The extraction was based on methodology previously used (12, 13, 14). For the extraction, about 3.00 g of each vegetable, previously homogenized in a food processor, were weighed in a digital semi-analytical balance. The vegetable was ground with phosphate buffer solution 0.1 M, pH 6.0, containing 1% ascorbic acid and 0,1% 2-mercaptoethanol, and vacuum-filtered in büchner filter. The volume was completed to 25 mL and the extract obtained was heated for approximately 12 minutes in water bath at 100 °C, under agitation. Afterwards, it was cooled, centrifuged (1789 g, for 30 minutes) and then, used for the deconjugation of polyglutamates.

For the deconjugation of polyglutamates into monoglutamates, 100 µL of rat plasma containing the enzyme conjugase (γ -glutamyl carboxipeptidase) were added to the obtained supernatant (3 mL) achieved in the procedure of extraction previously described. The extracts were placed in water bath at 37°C for 3 hours. Then, for enzymatic inactivation to occur, the extracts were heated in boiling water for 5 minutes (13).

Purification of the vegetable extract

The purification of the extract was carried out based on procedure previously described (13). The extract obtained in the previous procedure was purified using a strong ion exchange column, with stationary phase of Q-Sepharose, prepared in our laboratory. The column was pre-conditioned with methanol and water (1:1) at a flux of 1-2 drops/second (using peristaltic pump). Then, the extract was applied to the column at a flux of 2 drops/second, approximately. The column was washed with ultrapure water to remove the interfering components (flux of 1-2 drops/second). After that, the elution of the folates retained was performed with sodium acetate (0.1 M) containing 10% sodium chloride, 1% ascorbic acid and 0,1% 2-mercaptoethanol.

Before the chromatographic analysis, the extract was filtered through membranes with a porosity of 0.45 µm.

Folate Analysis by HPLC

The HPLC system (Shimadzu, SCL 10AD VP model) employed in the analysis of folates was composed of high pressure pump (valve for low pressure quaternary gradient pump), LC-10AD VP model; automatic injector with a loop of 50 μ L, SIL-10AF model and detector of fluorescence (RF10AXL model). The system was controlled by the Multi System software program, Class VP 6.12. The separation of folates was carried out in a Shim Pack 100 RP18 column, 150 mm x 4.6 mm, 4.6 μ m (Merck, Germany).

The chromatographic conditions used were: mobile phase composed of a binary gradient containing acetonitrile and phosphate buffer solution (NaH₂PO₄ 30 mM, pH adjusted for 2.3 with H₃PO₄); flow 0.7 mL/min; injection volume, 50 μ L, detection by fluorescence with excitation at 290 nm and emission at 360 nm. The gradient started with acetonitrile 6% (v/v), linearly increasing to 25% in 25 minutes. This concentration was maintained for 2 minutes, then, it returned to the initial conditions. The column was re-equilibrated for 15 minutes before the following run. The total running time was 43 minutes.

The identification of THF, 5-MTHF and 5-FTHF in the vegetable extracts was carried out by comparing the retention times obtained in the extracts with those obtained for the respective standards analyzed under the same conditions, and by co-chromatography.

Quantification of the isomers of folates in the vegetables was performed based on the analytical curves and regression equations achieved (THF: $Y = 1178396061x + 158374.83$; $R^2 = 0.99$; 5-MTHF: $Y = 1634094176x - 262055.40$; $R^2 = 0.99$; 5-FTHF: $Y = 119560115.8x - 1041248.88$; $R^2 = 0.98$). The real concentration in the vegetables was calculated based on the dilutions carried out.

Experimental design and statistical data analysis

For the study of the folate concentrations, it was considered a completely randomized design with two seasons of the year (winter and spring), five vegetables and four repetitions in each season. Analysis of variance was carried out ($\alpha = 5\%$) to verify the existence of significant differences between both seasons. For the evaluation of significant differences between the concentration of the compounds in raw and cooked vegetables, the paired t-test was applied, with 5% of pro-

bability. The vegetables were compared two by two (raw vegetable x cooked/stir fried vegetable). For this analysis, eight repetitions were considered (four repetitions in the winter and four in the spring).

All the statistical analyses were carried out using the SAS (Statistical Analysis System), version 9.1 (2002-2003), licensed for the Federal University of Viçosa.

RESULTS

Folate content in vegetables

The chromatographic conditions used allowed a good resolution of the folate peaks (THF, 5-MTHF and 5-FTHF), allowing for accurate quantification in the vegetables (Figure 1). All isomers were identified in the studied vegetables and the retention times were approximately 11, 14.5 and 20 min for THF, 5-MTHF and 5-FTHF, respectively.

Table 1 shows the data of the folate concentration in raw vegetables.

The total folate concentration varied from 154.79 μ g/100 g in stir fried spinach (lowest value) to 803.74 μ g/100 g in stir fried broccoli leaves (highest value).

There were no significant differences on folate concentrations between the two seasons evaluated (winter and spring) for any samples (data not shown).

The percentage of retention of each folate isoform after the use of different cooking methods for vegetables is demonstrated in Figure 2.

The retention of the isomers in the vegetables after being boiled varied from 17.01% to 87.21% for THF, 53.41 to 94.07% for 5-MTHF and 39.04 to 107.9% for 5-FTHF. THF was the less stable isomer, while 5-MTHF was considered the most stable for the cooking processes.

It is verified that the lowest retention occurred in florets of broccoli cooked under immersion, which preserved only around 17% of the THF concentration after they were boiled. Apparently, there was a great reduction in folate retention, even in those vegetables that did not present any statistically significant differences after cooking. The sliced kale, for example, presented a retention similar to 71.81%, 79.01% and 79.4% of THF, 5-MTHF and 5-FTHF after being stir fried, while the stir fried mustard presented a retention of 64.35% for THF, 66.23% for 5-MTHF and 39.04% for 5-FTHF.

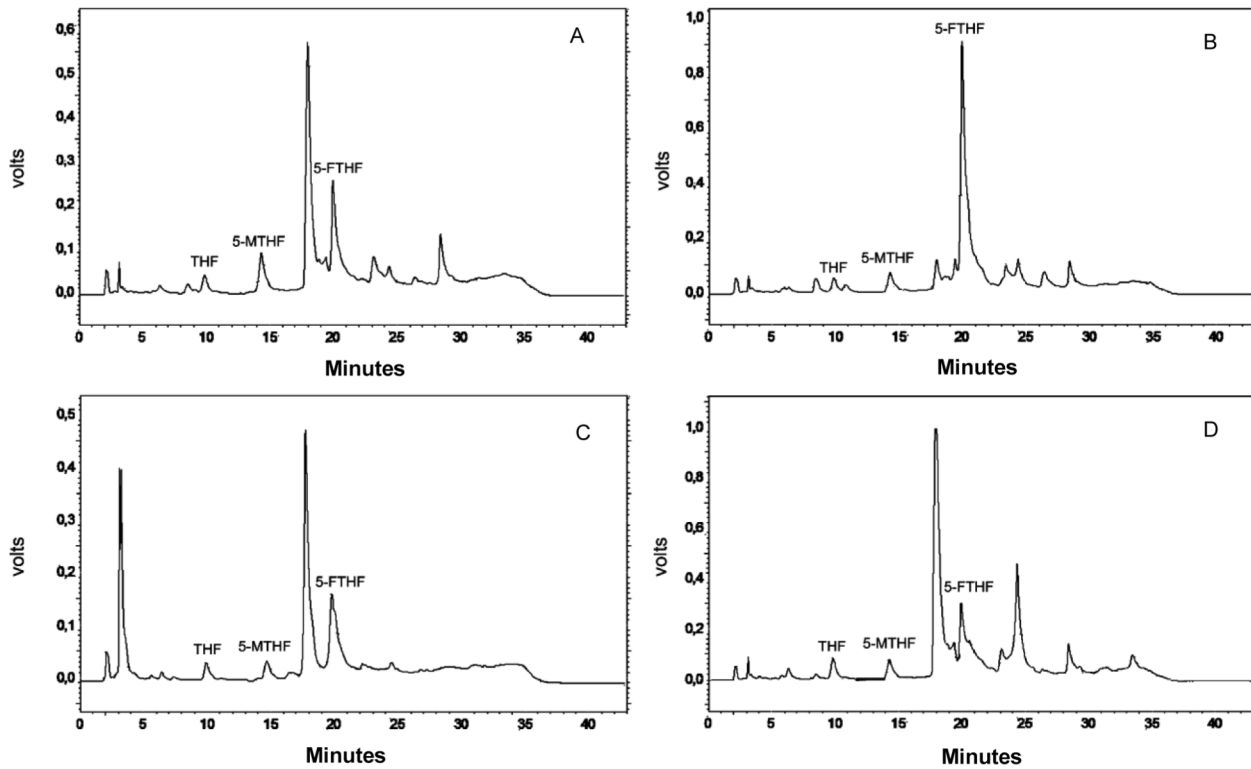


FIGURE 1. Typical chromatograms of the folate isomers in raw and cooked vegetables. (A) Raw spinach; (B) Stir fried spinach; (C) Raw broccoli florets; (D) Boiled broccoli florets. Chromatographic conditions described in Materials and Methods.

TABLE 1. Concentration of folates (isomers and total folates) in raw and cooked vegetables (in $\mu\text{g}/100$ g of fresh matter).

Vegetables	THF	5-MTHF	5-FTHF	Folates (Sum)	True Retention (%)
Raw kale	72.91 \pm 46.05	67.02 \pm 41.63	409.79 \pm 379.39	549.71 \pm 267.89	--
Stir fried sliced kale	56.22 \pm 30.12	56.84 \pm 30.00	347.16 \pm 285.00	460.22 \pm 211.99	77.97
Stir fried torn kale	53.63 \pm 22.93	56.22 \pm 30.93	300.56 \pm 260.41	410.41 \pm 187.30	72.30
Raw broccoli florets	69.46 \pm 57.67	123.12 \pm 91.29	562.01 \pm 415.20	754.59 \pm 326.82	--
Steam cooked broccoli florets	26.40 \pm 18.37***	102.19 \pm 87.60	354.55 \pm 96.67	483.14 \pm 257.77	70.46
Boiled broccoli florets	10.83 \pm 5.07***	87.99 \pm 65.53	297.29 \pm 138.25***	396.11 \pm 219.19****	57.24
Raw broccoli leaves	60.71 \pm 32.42	219.40 \pm 87.47	451.40 \pm 264.12	731.51 \pm 306.76	--
Stir fried broccoli leaves	56.61 \pm 35.63	226.31 \pm 68.80	520.82 \pm 391.18	803.74 \pm 356.23	102.03
Raw spinach	24.57 \pm 21.89	42.72 \pm 26.59	173.77 \pm 73.22	241.06 \pm 81.29	--
Stir fried spinach	13.25 \pm 12.97	27.11 \pm 15.92	114.43 \pm 69.49	154.79 \pm 60.76	54.04
Raw mustard	71.67 \pm 60.85	164.93 \pm 32.41	327.78 \pm 289.94	564.38 \pm 234.22	--
Stir fried mustard	44.13 \pm 38.40	112.67 \pm 30.10	129.84 \pm 65.91	286.64 \pm 91.39	53.20

Mean of eight repetitions \pm standard deviation. The mean values were significantly different from the raw vegetables (paired t-test: *** $P < 0.005$ **** $P < 0.001$).

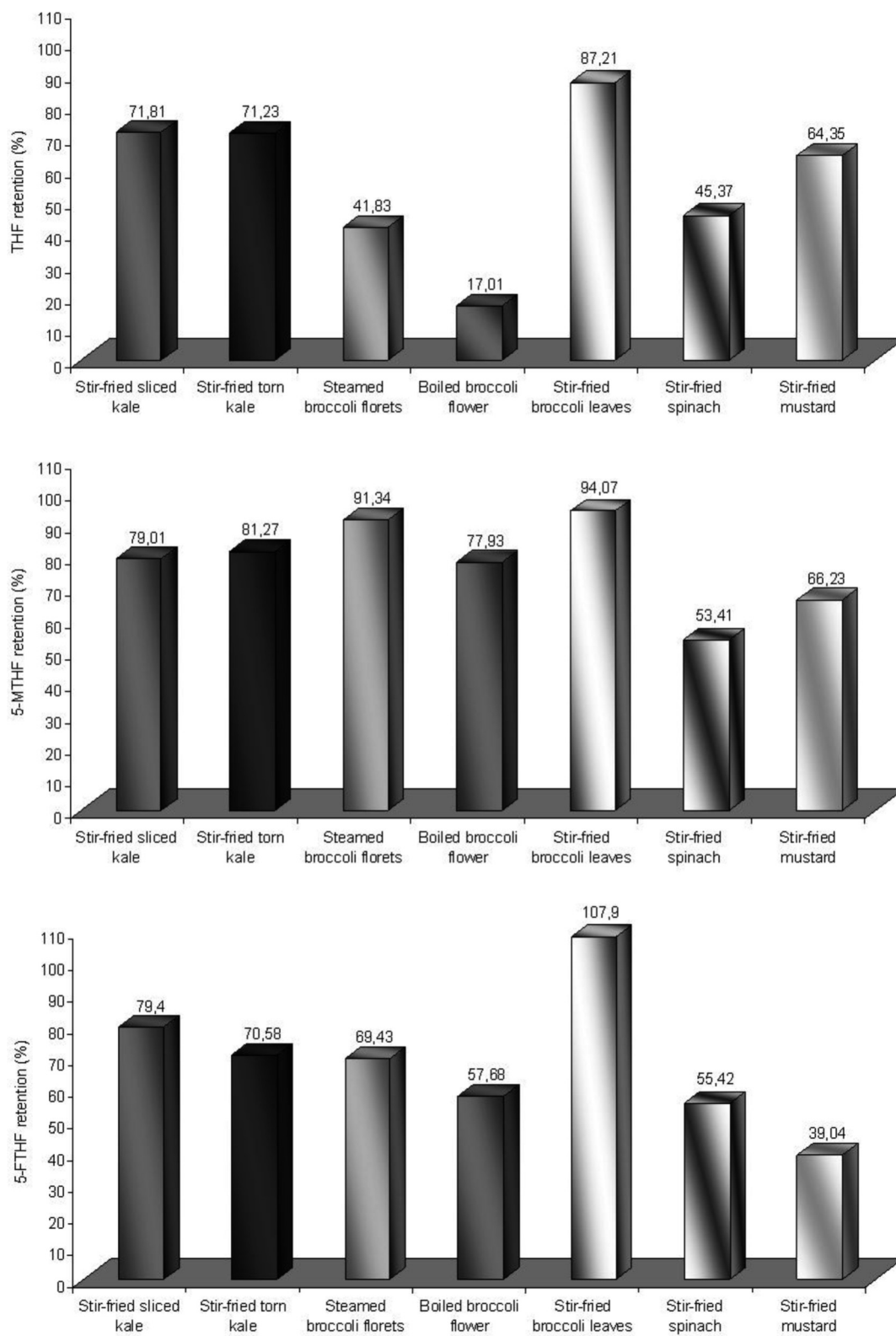


FIGURE 2. Retention of the isomers of folates in leafy vegetables submitted to cooking.

DISCUSSION

Although no studies were previously found evaluating the folate concentration in broccoli leaves, it was observed that this vegetable, commonly rejected during the pre-preparation stages, contributes with great concentrations of this vitamin. Therefore, its consumption, in soups, souffles and salads must be encouraged. Several works report vitamin concentrations in kale, but no studies were found focusing on folate concentrations in this vegetable, indicating the pioneering character of this research.

A study (14) found a total folate concentration in broccoli florets similar to that found in the present work. The authors detected a concentration of 866 $\mu\text{g}/100\text{g}$, but this value is usually higher than those verified in other works (4, 10, 12), in which the concentrations of this vitamin were 427.8 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 114 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and 102 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectively.

In spinach, the total folate concentrations were in accordance with what has been previously found. A study (15) reported a folate concentration in this vegetable of 302 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Other studies (16, 17) reported folate concentrations of 364 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and 193 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectively, using a similar methodology to the one used on this present study.

The only work found that deals with the folate concentration in mustard (15) detected the concentration of 278 $\mu\text{g}/100\text{g}$ of this vitamin, a lower value than that found on this work.

Through the analysis of the United States Department of Agriculture table (18), it is observed that, in general, the folate concentrations found in our study were higher, except the kale, which presented lower concentrations. According to this table, the total folate concentrations for broccoli florets, kale, spinach and mustard (evaluated through the microbiological method) were, respectively, 160 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 764 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 52 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and 137 $\mu\text{g}/100\text{g}$.

The variation in the folate concentrations found in the present work, compared to other studies, can be explained by factors that would lead to higher or lower synthesis of this vitamin in vegetables. In fruits and vegetables, the folate isomers and their distribution in different portions are affected by light, since the synthesis of the vitamin occurs in the photorespiration (10). The degree of maturity is also important, since

folates act in the cell division process and their quantity is higher in the tissues that are being divided than in the mature ones (19). Minerals such as potassium and magnesium are also very important for the fruit and vegetable production of folates, participating in one of the stages of this vitamin's biosynthesis (12). Also, the analytical methodology in this case is very important since the results of folate content using other methods may be different from those obtained by HPLC.

It is important to emphasize that the different methodologies used for the extraction and analysis also lead to significant variations in folate concentration. The official method, based on microbiological assay, quantifies the total folate concentration present in the samples, while biospecific techniques and HPLC determine the most common isomers found, which have different roles in the metabolism.

Effects of cooking methods on folate retention

It was observed that the boiling method presented the lowest capacity to preserve the concentration of 5-FTHF and THF in broccoli florets (see Table 1). Also, the steam-boiling was not efficient either to preserve THF in these vegetables. The stir frying method did not cause significant reduction of folate concentrations in the vegetables studied. It is important to emphasize that, for this method, the cooking time was short (2 minutes), however, the steam boiling and boiling methods occurred over a longer period of time (about 6 minutes for both methods). Besides, since folate is a hydrosoluble vitamin, it is more easily lost in boiling water. None of the methods evaluated promoted a significant reduction ($p>0.05$) in the concentration of 5-MTHF.

To determine if a larger surface of exposure to oxygen would promote significant losses of folates in kale, the sliced and torn preparation methods were analyzed. It is known that a larger surface area and the geometric manner in which the vegetable is cut may affect the losses of folates. However, in the present work, no effects on the retention of folates in kale caused by cutting were observed.

Our study showed that the broccoli leaves presented a concentration of folate isomers similar to those found in broccoli florets (part usually eaten). When stir fried, similarly to the other vegetables analyzed under the same conditions, the broccoli leaves did not

present significant reduction in folates.

In a study on the retention of folates in foods commonly consumed by the population of the United Kingdom (1), the total folate concentrations found (evaluated by the microbiological method) in raw spinach varied from 189.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ to 191.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, and in raw broccoli florets from 172 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ to 177 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. After boiling, the concentration of this vitamin was significantly reduced to 94.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and 102.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in spinach and broccoli, respectively. Selection of the cooking methods may explain the losses since folates may be lost by lixiviation, although the folate content in the water after cooking the vegetables was not assessed in this study. On the other hand, the steam cooked broccoli florets did not present significant losses of total folates. In the present study, losses were observed in both boiling and steam boiling.

In a study regarding the effect of cooking spinach (10), a reduction in the concentration of 5-MTHF from 552.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ to 127.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ was found, different from the findings of the present study, in which the concentrations of 5-MTHF in all vegetables analyzed remained stable after boiling. Moreover, in the study developed by those authors, a reduction of 5-FTHF from 7.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ to 1.6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ was observed after boiling in water. The authors did not notice the presence of THF in the vegetable studied. It has been observed that in most of the previous works, concentrations of 5-FTHF were lower than those detected in the present study.

Other authors also found considerable folate losses in spinach after boiling. In a previous study (18), authors observed losses of 83% in the concentration of total folates, while other authors (20) reported losses of 70% in the concentration of this vitamin. Although the steam boiling method was not analyzed by these authors, they suggest that this cooking method presents greater capacity to retain folates when compared to the immersed boiling method, supporting the results of the present study, where 5-FTHF retention was higher in the first cooking method.

Another study (1) verified that folate retention in spinach after boiling was 49%, and the concentrations varied from 191.8 to 94.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$ for the vegetable in natura and after boiling, respectively. Similarly, the retention of folates in broccoli was 44% (177.1 and 77 $\mu\text{g}/100\text{g}$, in natura and after boiling, respectively). The steam boiling method did not cause statistically

significant losses of folates for these two vegetables, and resulted in a significantly higher retention in both vegetables when compared to boiling. In our study, the steam boiling method preserved the concentration of 5-MTHF and 5-FTHF in broccoli florets, but it was not effective in the preservation of THF.

No other previous work was found regarding folate losses after cooking kale, broccoli and mustard leaves, demonstrating the importance and contribution of data gathered from the present study.

A study regarding folate retention in vegetables (21), low retention of this vitamin was indicated during cooking, possibly due to lixiviation. Sliced, frozen and fried potatoes presented half the folate concentration of raw potatoes (dry basis). Sliced carrots lost approximately 40% of their folate concentration during boiling. Although the vegetables analyzed by these authors are not similar to those in the present study, the data suggests concerns related to folate retention after the different cooking methods.

Another study (14) revealed significant folate losses in potatoes in function of the food preparation conditions. The greatest retention occurred with the sous-vide method (103%), followed by boiling (72-59%), and finally by steam cooking (63%). In the present study, the boiling (immersed in water) was not effective to preserve folates in vegetables.

The high standard deviation values observed in this study (Table 1) are common in works involving the analysis of vitamins in food matrices. Due to the great biological variability among these foods, wide data variation is expected, even when researchers attempt to reduce sample heterogeneity, collecting samples of the same variety, same cultivation location, same maturity stage, in randomly selected collection locations and complete homogenization of vegetables before the extraction procedure. In this study we attempted to minimize this bias by collecting the vegetables at the same commercialization stage, obtaining as many repetitions as possible (eight repetitions) and mixing large quantities of representative samples (1-2 kg of each vegetable) before removing aliquots for analysis. However, in the present study we worked with a real consumption situation, in which the population cannot control the acquisition of the same vegetable variety. Vegetables were obtained from different producers, who grew different varieties of the same vegetable. Thus, samples from different variety of each vegetable

were obtained, which increases their variability.

In another study (10), only the isomers 5-MTHF and 5-FTHF were found in broccoli florets. Loss of these isomers after boiling in water was approximately 68%, and 53% of the concentration lost was found in the boiling water, indicating that losses were mainly caused by lixiviation. On the other hand, in other work (14) the authors observed lower folate losses in broccoli after boiling in water, approximately 24.5%. Our study reported intermediate losses of 5-FTHF in relation to both previously mentioned works, after the boiling of broccoli florets in water (retention of 57.68%).

Another study detected folate losses by lixiviation in spinach after boiling of approximately 74% for 5-MTHF and 56% for 5-FTHF (10). Approximately 58% of the 5-MTHF concentration and about 39% of 5-FTHF migrated to the boiling water. The authors reported that 20% of the total folates probably degraded during household processing (washing, slicing and heat losses). In our work boiled spinach was not analyzed, but instead stir fried, which presented lower folate isomer losses.

Differences in the retention of folates in several vegetables submitted to boiling in water were previously studied (22). The highest retention was found in Brussels sprout, cauliflower and broccoli. After 8 minutes of cooking, more than 75% of the initial concentration of 5-MTHF remained in these vegetables. Lower values of retention of this isomer were found in spinach, cabbage and carrot, varying between 37 and 52% of the initial concentration. Our work also showed the preservation of 5-MTHF, but this result was similar for all the vegetables studied, differently from the work of these authors.

Some authors consider that other cooking methods, which were not evaluated in this study, also promoted good retention (approximately 80%) of folates in vegetables, such as pressure boiling and on the microwave oven (23, 24). Moreover, the method of stir-frying is able to preserve the content of folate in vegetables compared to cooking in water due to the nature of this vitamin (water soluble).

The strong relation between the losses of folate and the duration of cooking may partly explain the losses of vitamin observed in this study and in works of other authors. In a study (25), authors observed losses of up to 78% of folates in spinach after ten minutes of boiling in water, while other (1) reported 51% of folate

losses after three minutes of boiling in water. In the present work, boiled spinach was not analyzed, but broccoli florets immersed and cooked presented significant losses. It may be due to the fact that the vegetable remained for about six minutes in contact with water, in comparison to the two minutes in which the stir fried vegetables were in contact with oil.

The solubility of the folates in water is a characteristic that considerably affects their loss, mainly by lixiviation, when there is a direct contact between the vegetable and the boiling water (10). Although the vegetables in this study have presented high concentration of folates, the losses occurred during the process of boiling in water must be considered in researches about food consumption.

CONCLUSIONS

There were no significant differences on folate concentrations between the two seasons evaluated (winter and spring) for any samples.

Retention of folates in leafy vegetables was strongly dependent on each vegetable, the method of cooking and the isomeric form. Stir frying preserved the concentration of this vitamin in vegetables, while boiling was the method that caused the greatest losses of THF and 5-FTHF.

As the tests were conducted on laboratory scale, simulating domestic preparation, it is necessary to perform further studies to assess folate losses after the stages of handling and preparation on a large scale, as the foodservices, increasing information about the nutritional quality of vegetables consumed routinely.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CAPES for the granting of the master's scholarship and FAPEMIG, for the scientific initiation scholarship.

REFERENCES

1. Mckillop DJ, Pentieva K, Daly D, Mcpartlin JM, Hughes J, Strain JJ, Scott JM, McNulty H. The effect of different cooking methods on folate retention in various food that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Brit J Nutr.* 2002; 88: 681-8.
2. Gregory JF. Chemical and nutritional aspects of folate research, analytical procedures, methods of folate

- synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv Food Nutr Res.* 1989; 33: 1-101.
3. McNulty H. Folate requirements for health in different population groups. *Brit J Biomed Sci.* 1995; 52: 110-9.
 4. Mullin WJ, Wood DF, Howsam SG. Some factors affecting folacin content of spinach, Swiss chard, broccoli and Brussels sprouts. *Nutr Rep Int.* 1982; 26: 7-19.
 5. Hawkes GG, Villota R. Foliates in foods: reactivity, stability during processing and nutritional implications. *Crit Reviews Food Sci Nutr.* 1989; 28: 439-538.
 6. Eitenmiller RR, Landen WO. Folate. In: *Vitamin Analysis for the Health and Food Science.* 2nd Edition; Eitenmiller RR, Landen WO Ed. 1999; 411-65.
 7. Varela-Moreiras G, Aperte EA, Prieto RP. La determinación "in vitro/in vivo" de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza. 2000; Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo-CEU, Madrid.
 8. Ball GFM. Folate. In: *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods.* 1st Edition; Ball, GFM. Ed. Chapman & Hall, London, UK, 1998; 439 - 87.
 9. Blakely RL. The biochemistry of folic acid and related pteridines. In: *Frontiers of Biology.* 1st Edition; Neuberger A.; Tatum, E.L. Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1969; 92-4.
 10. Lima-Pallone JA, Catharino RR, Godoy, HT. Determinação de folatos em espinafre – avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. *Arch Latinoamer Nutr.* 2008; 58: 81-6.
 11. Murphy EW, Criner PE, Gray BC. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *J Agric Food Chem.* 1975; 23: 153-157.
 12. Vahteristo L, Lehtikoinen K, Ollilainen V, Varo P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chem.* 1997; 59: 589-97.
 13. Jastrebova J, Witthöft C, Grahn A, Svensson U, Jägerstad M. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chem.* 2003; 80: 579-88.
 14. Stea TH, Johansson M, Jägerstad M, Frolich W. Retention of folates in cooked and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. *Food Chem.* 2006; 101: 1095-107.
 15. Iwatany Y, Arcot J, Shrestha AK. Determination of folate contents in some Australian vegetables. *J Food Comp Anal.* 2003; 16: 37-48.
 16. Lin BF, Lin RF. Effect of Chinese stir-fry cooking on folate contents of vegetables. *J Chin Agric Chem Soc.* 1999; 37: 443-54.
 17. Shrestha AK, Arcot J, Paterson J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryo-protected *Lactobacillus casei*. *Food Chem.* 2000; 71: 545-52.
 18. USDA. United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference. Nutrient Data Laboratory Home Page: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>. Access: Feb 23rd 2012.
 19. Scott J, Rébeille F, Fletcher J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric.* 2000; 83: 1389-1402.
 20. Puupponem-Pimia R, Hakkinen ST, Aarni M, Suortti T, Lampi AM, Euroala M, Piironen V, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM. Blanching and long-term freezing effect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *J Sci Food Agric.* 2003; 83: 1389-1402.
 21. Hoppner K, Lampi B. Folate retention in dried legumes after different methods of meal preparation. *Food Res Int.* 1993; 26: 45-8.
 22. Holasová M, Fiedlerová V, Vavreinová S. Determination of folates in vegetables and their retention during boiling. *Czech J Food Sci.* 2008; 26: 31-7.
 23. Dang J, Arcot J, Shrestha A. Folate retention in selected processed legumes. *Food Chem.* 2000; 68: 295-8.
 24. Chen TS, Song YO, Kirsch AJ. Effects of blanching, freezing and storage on folacin contents of spinach. *Nutr Rep Int.* 1983; 28: 317-21.
 25. Leichter J, Switzer VP, Landymore AF. Effect of cooking on folate content of vegetables. *Nutr Rep Int.* 1978; 18: 475-79.

Recibido: 17-09-2013

Aceptado: 07-03-2014

Nuevos Libros

Umami y glutamato. Aspectos químicos, biológicos y tecnológicos

Editor: Félix Guillermo Reyes Reyes.

Con apoyo de: IGTC-International Glutamate Technical Committee.

IGIS- International Glutamate Information Service.

IGSSA- Institute for Glutamate Sciences in South America

Editora Pleiade. Sao Paulo. Brasil. 2013.

ISBN: 978-85-7651-228-8; 645 páginas

El objetivo perseguido con la difusión de este libro es aportar información en el idioma español a estudiantes de pregrado y postgrado, a la academia y a otros profesionales que trabajan en áreas de la salud, ciencia de los alimentos, nutrición, gastronomía y en aspectos legales vinculados al umami, el quinto gusto básico. Un grupo de 23 profesionales abordan el temario desde diversos campos del conocimiento de una manera sencilla, didáctica y placentera y nos ilustran como cada vez más la ciencia está conectada con la gastronomía. En 1908, el profesor Kikunae Ikeda, científico japonés, identificó el ácido glutámico libre y sus sales extraídas del caldo dashi, un plato típico en la cocina japonesa, como responsables del gusto umami, pero no es sino hasta el año 2000 que científicos del área de la salud demuestran la presencia de receptores en la boca que responden específicamente al umami, ello prueba que es un gusto independiente y no el resultado de la interacción de los otros. Han transcurrido 106 años desde el descubrimiento del umami, en ese lapso, son muchas las investigaciones

realizadas que aportan nuevos conocimientos en el campo de los receptores del glutamato y sus sales. La información dada se organizó en siete partes: Parte I. Revisión histórica del umami en culturas ancestrales. Parte II. Aspectos químicos y la presencia de glutamato en alimentos de diversos orígenes. Parte III. Aspectos bioquímicos, nutricionales, fisiológicos, endocrinos, intolerancia y efectos tóxicos del glutamato. Parte IV. Seguridad del glutamato como aditivo. Parte V. Aspectos sensoriales. Parte VI. Aspectos tecnológicos. Parte VII. Aspectos regulatorios del glutamato monosódico como aditivo. La bibliografía que se cita está actualizada lo cual es de utilidad para los interesados en la temática desarrollada.

Elba Sangronis

Departamento de Procesos Biológicos
y Bioquímicos
Universidad Simón Bolívar
Venezuela

INFORMACION PARA LOS AUTORES

En 1950 el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela edita su revista Archivos Venezolanos de Nutrición la cual en 1966 es donada a la recién creada Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN, para convertirse en su órgano oficial de divulgación Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN.

ALAN acoge en sus páginas trabajos de investigación originales sobre temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, nutrición clínica y comunitaria, educación en nutrición, ciencia y tecnología de alimentos, microbiología de alimentos, revisiones científicas críticas, Editoriales y Cartas al Editor.

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados No se mantendrá correspondencia sobre aquellos que no sean publicados.

REQUISITOS PARA LA PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS VÍA ELECTRÓNICA

Resumen de requisitos:

- Todas las partes del manuscrito estarán presentadas en versión Word a doble espacio, con letra Times New Roman (tamaño 12) en páginas tamaño carta. El trabajo debe tener una extensión no mayor de 23 páginas, incluyendo las Tablas, Figuras e ilustraciones si la hubiere, las cuales deben estar incorporadas al final del texto. Todas las páginas deben estar numeradas.
- Revise la secuencia general: Título del manuscrito y autores, Resumen y palabras clave, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, Tablas y Figuras.
- Adjunte carta de presentación y aceptación de autoría firmada por los investigadores involucrados. Los autores podrán sugerir los nombres de tres posibles árbitros con sus respectivas direcciones electrónicas.
- Envíe el manuscrito junto con la carta de presentación, a la siguiente dirección electrónica: info@alanrevista.org

PORTADA

Debe contener: Título del manuscrito. Nombres, apellidos y la afiliación institucional de los autores. Nombre, dirección postal, número de teléfono y dirección de correo electrónico del autor encargado de la correspondencia.

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Escrito en forma corrida y no en secciones, que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. Agréguese de 3 a 6 palabras clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo. ALAN exige que si el trabajo original es en español o en inglés, deberá acompañarse de un resumen en inglés o en español o alternativamente en portugués con sus palabras clave.

INTRODUCCIÓN

Enuncie la finalidad o el objetivo de investigación específico del estudio u observaciones, o bien la hipótesis que se ha puesto a prueba. Cite las referencias estrictamente pertinentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identifique los métodos, los aparatos y equipos (nombre y dirección del fabricante) y los procedimientos realizados. Identifique los reactivos y productos químicos utilizados.

Describa los métodos estadísticos con detalles e indique el método y modelo estadístico.

RESULTADOS

Limite las Tablas y las Figuras al número necesario para explicar el argumento y resultados de la investigación y evaluar los datos en que se apoya. Se sugiere un máximo de 5 Tablas y 3 Figuras.

DISCUSIÓN

Breve y concisa, contrastada con observaciones realizadas en otros estudios. Proponga nuevas hipótesis cuando

haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales.

CONCLUSIONES

Refiérase a las más relevantes y oriente sobre posibles vías para continuar la investigación o el estudio emprendido. No cite referencias bibliográficas en esta sección.

AGRADECIMIENTOS

Mencione la procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones (equipos, reactivos, medicamentos) y a las instituciones financiadoras del estudio, dependencia e instituciones que apoyaron su ejecución, así como a personas y colaboradores.

TABLAS Y FIGURAS

Numérelas consecutivamente en arábigos siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto. Cerciórese de que cada Tabla y Figura aparezca citada en el manuscrito.

REFERENCIAS

En el texto numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez y se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis.

Las Referencias serán listadas al final del manuscrito en orden numérico, no en orden alfabético. La veracidad de la información contenida en ésta sección es responsabilidad del autor (de los autores).

COSTO POR PÁGINA

Debido a los altos costos de impresión y publicación, ALAN ha estipulado dentro de su política editorial el costo de US \$ 20 por concepto de página publicada, suma que deberá ser agenciada por los autores a través de sus subvenciones de investigación o ante las instituciones donde prestan sus servicios. Se hace notar sin embargo, que este costo por página no condicionará de manera alguna la aceptación y publicación del trabajo, lo cual estará dado por los méritos del mismo.

Debido a que no existe al presente una traducción oficial al español, se transcribe por razones de espacio, solo el título del documento que sigue: **RECOMMENDATIONS FOR THE CONDUCT, REPORTING, EDITING, AND PUBLICATION OF SCHOLARLY WORK IN MEDICAL JOURNALS Updated DECEMBER 2013**. Para una lectura completa de esta versión, los autores deben acudir al siguiente sitio: <http://www.icmje.org>