

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la  
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

---

**VOL 59**

**SEPTIEMBRE 2009**

**Nº 3**

---

## Contenido

Páginas

### ARTICULOS GENERALES

- Cambios en el índice de masa corporal en adolescentes y adultas entre el embarazo y el posparto**  
*María Cecilia Severi T, Rafael Alonso, Eduardo Atalah S.....* 227
- Caracterización de un modelo en ratas, útil en el estudio de las consecuencias nutricionales de la diarrea**  
*Olga Carolina Aristimuño, Anna María Cioccia, Marlén Gutiérrez, Diamela Carías y Patricio Hevia .....* 235
- Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos**  
*Mayi Agueda, María Ángeles Zulet, José Alfredo Martínez .....* 245

### PERSPECTIVA

- Intervenciones aleatorias controladas basadas en las escuelas para prevenir la obesidad infantil: revisión sistemática de 2006 a 2009**  
*M.E. Pérez-Morales, M. Bacardí-Gascón, A. Jiménez-Cruz y A. Armendáriz-Anguiano .....* 253

### TRABAJOS DE INVESTIGACION

#### Nutrición Humana

- Estado nutricional en la telarquia y menarquia de adolescentes chilenas indígenas y no indígenas**  
*Hugo Amigo, Thais Costa Machado, Patricia Bustos. ....* 260
- Estado nutricio de vitamina A en preescolares con padecimientos oculares**  
*Emma T. Villaseñor-Fierro, Edgar Vásquez-Garibay, Enrique Romero-Velarde, Miguel Kumazawa-Ichikawa, Salvador Villalpando-Hernández, Ezequiel Vélez-Gómez .....* 266

## Nutrición Infantil

- Efecto de una bebida láctea con DHA en la composición de ácidos grasos del glóbulo rojo, de la leche materna y en el recién nacido**  
*Eduardo Atalah S, Marcela Araya B, Gastón Rosselot P, Héctor Araya L, Gloria Vera A, Ramón Andreu R, Catalina Barba G, Lorena Rodríguez* ..... 271

## Nutrición Clínica

- Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women**  
*Phuong H. Nguyen, Ruben Grajeda, Paul Melgar, Jessica Marcinkevage, Ann M. DiGirolamo, Rafael Flores, Reynaldo Martorell* ..... 278

## Bioquímica Nutricional

- Comparing the impact of chronic energy restriction and vitamin E supplementation on the behavior of adult rats**  
*Derlange B. Diniz, Suzana L. de Oliveira, Liana L. Melo, Jaime Amaya-Farfan* ..... 287
- Adiponectina, insulina y glicemia, en individuos con sobrepeso u obesidad sometidos a un régimen de alimentación rico en carbohidratos complejos**  
*Dora Cristina González Rodríguez, Liseti Solano R., Julio César González Martínez* ..... 296

## Educación en Nutrición

- Etapas del cambio relacionadas con el consumo de frutas y verduras, actividad física y control del peso en estudiantes universitarios chilenos**  
*María Angélica Mardones H., Sonia Olivares C., Jacqueline Araneda F., Nelly Gómez F.* ..... 304

## Inocuidad de Alimentos

- Diseño de un plan HACCP en el procesamiento industrial de sardinas congeladas**  
*Patricia Rosas y Genara Reyes* ..... 310

## Microbiología de Alimentos

- Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicum esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia. Venezuela**  
*Luis Guillermo Ramírez Mérida, Alba Morón de Salim, Ana Yudith Alfieri Graterol y Orlando Gamboa* ..... 318

## Ciencia de Alimentos

- Efecto de la adición de harina de soja y concentrado proteico de suero de queso sobre la calidad del pan y la dializabilidad de minerales**  
*Alexis N. Visentín, Silvina R. Drago, Carlos A. Osella, María A. de la Torre, Hugo D. Sánchez y Rolando J. González* ..... 325
- Formulación de alimentos para celíacos con base en mezclas de harinas de quínoa, cereales y almidones**  
*Valeria Del Castillo, Gerardo Lescano, Margarita Armada* ..... 332

## LatinFoods. Composición de Alimentos

- Composição lipídica do molusco marinho berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791)“in natura” e cozido**  
*Mariana Vincenzi Aveiro, Daniel Barrera-Arellano, Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte* ..... 337

- NUEVOS LIBROS** ..... 342

- INFORMACION PARA LOS AUTORES** ..... 343

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the  
Latin American Society of Nutrition

---

VOL 59

SEPTEMBER 2009

Nº 3

---

## Contents

	Pages
<b>GENERAL ARTICLES</b>	
<b>BMI changes in adolescents and adults women between pregnancy and pospartum</b> <i>María Cecilia Severi T, Rafael Alonso, Eduardo Atalah S.....</i>	227
<b>Characterization of a rat model useful for studying the nutritional consequences of diarrhea</b> <i>Olga Carolina Aristimuño, Anna María Cioccia, Marlén Gutiérrez, Diamela Carías y Patricio Hevia .....</i>	235
<b>Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on human lipid profile</b> <i>Mayi Agueda, María Ángeles Zulet, José Alfredo Martínez .....</i>	245
<b>PERSPECTIVE</b>	
<b>Randomized controlled school based interventions to prevent childhood obesity: systematic review from 2006 to 2009</b> <i>M.E. Pérez-Morales, M. Bacardí-Gascón, A. Jiménez-Cruz y A. Armendáriz-Anguiano .....</i>	253
<b>RESEARCH PAPERS</b>	
<b>Human Nutrition</b>	
<b>Nutritional status in telarche and menarche in indigenous and non indigenous Chilean adolescents</b> <i>Hugo Amigo, Thais Costa Machado, Patricia Bustos. ....</i>	260
<b>Nutritional status of vitamin A in preschoolers with ocular diseases</b> <i>Emma T. Villaseñor-Fierro, Edgar Vásquez-Garibay, Enrique Romero-Velarde, Miguel Kumazawa-Ichikawa, Salvador Villalpando-Hernández, Ezequiel Vélez-Gómez .....</i>	266

## Infant Nutrition

### **Consumption of a DHA-enriched milk drink by pregnant and lactating women, on the fatty acid composition of red blood cells, breast milk, and in the newborn**

*Eduardo Atalah S, Marcela Araya B, Gastón Rosselot P, Héctor Araya L, Gloria Vera A, Ramón Andreu R, Catalina Barba G, Lorena Rodríguez* ..... 271

## Clinical Nutrition

### **Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women**

*Phuong H. Nguyen, Ruben Grajeda, Paul Melgar, Jessica Marcinkevage, Ann M. DiGirolamo, Rafael Flores, Reynaldo Martorell* ..... 278

## Nutritional Biochemistry

### **Comparing the impact of chronic energy restriction and vitamin E supplementation on the behavior of adult rats**

*Derlange B. Diniz, Suzana L. de Oliveira, Liana L. Melo, Jaime Amaya-Farfan* ..... 287

### **Adiponectin, insulin and glucose concentrations in overweight and obese subjects after a complex carbohydrates (fiber) diet**

*Dora Cristina González Rodríguez, Liseti Solano R., Julio César González Martínez* ..... 296

## Nutritional Education

### **Stages of change related to fruit and vegetables consumption, physical activity, and weight control in Chilean university students**

*María Angélica Mardones H., Sonia Olivares C., Jacqueline Araneda F., Nelly Gómez F.* ..... 304

## HACCP

### **Design of a HACCP Plan for the industrial process of frozen sardines**

*Patricia Rosas y Genara Reyes* ..... 310

## Food Microbiology

### **Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and coriander (*Coriandrum sativum*) in three markets of Valencia, Venezuela**

*Luis Guillermo Ramírez Mérida, Alba Morón de Salim, Ana Yudith Alfieri Graterol and Orlando Gamboa* ..... 318

## Food Science

### **Effect of the addition of soy flour and whey protein concentrate on bread quality and mineral dialyzability**

*Alexis N. Visentín, Silvina R. Drago, Carlos A. Osella, María A. de la Torre, Hugo D. Sánchez y Rolando J. González* ..... 325

### **Foods formulation for people with celiac disease based on quinoa (*Chenopodium quinoa*), cereal flours and starches mixtures**

*Valeria Del Castillo, Gerardo Lescano, Margarita Armada* ..... 332

## LatinFood. Food Composition

### **Lipid composition of marine shellfish berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) raw and cooked**

*Mariana Vincenzi Aveiro, Daniel Barrera-Arellano, Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte* ..... 337

**NEW BOOKS** ..... 342

**INFORMATION FOR AUTHORS** ..... 343

## Cambios en el índice de masa corporal en adolescentes y adultas entre el embarazo y el posparto

*María Cecilia Severi T, Rafael Alonso, Eduardo Atalah S.*

Centro Latinoamericano de Perinatología, Universidad de la República, Uruguay, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile

**RESUMEN.** Los objetivos fueron evaluar las consecuencias del embarazo en el IMC de las adolescentes en comparación con adultas e identificar los factores que aumentan el riesgo de un IMC bajo en el posparto. Se estudiaron 742 adolescentes (13 a 19 años) y 779 adultas (25 a 34 años) de Guatemala, República Dominicana y Uruguay. Se midieron variables demográficas, sociales, obstétricas, ganancia de peso e IMC antes de las 14 semanas de gestación y a los  $4 \pm 1$  mes posparto. El IMC en adultas se clasificó según la OMS y en adolescentes según NCHS/OMS. Por análisis logístico uni y multivariado se estimó el riesgo de un IMC bajo en el posparto. Al inicio se observó mayor prevalencia de bajo peso en adolescentes y de sobrepeso y obesidad en adultas ( $p < 0,001$ ). El incremento de peso en la gestación fue mayor en las adolescentes ( $p < 0,01$ ). Hubo cambios significativos en el IMC posparto de las adolescentes, con aumento del sobrepeso y obesidad ( $p < 0,001$ ). Las variables que más se asociaron con bajo IMC en el posparto fueron el IMC bajo al inicio del embarazo (OR 25,6 IC 12,6 – 52), la adolescencia (OR 3,5 IC 1,7 – 7,1) y una ganancia de peso  $< 300$  g. semanales (OR 2,2 IC 1,1 – 4,1). En conclusión no se observó deterioro del estado nutricional de las adolescentes luego de la gestación y la variable que más se asoció con bajo IMC post parto fue el IMC con que la madre inició el embarazo.

**Palabras clave:** Embarazo, adolescentes, estado nutricional, peso bajo, IMC materno posparto.

**SUMMARY. BMI changes in adolescents and adults women between pregnancy and postpartum.** The aim of the study was to evaluate pregnancy nutritional consequences in adolescent pregnant women and to identify factors which increase risk of an adverse postpartum nutritional result. We conducted a prospective cohort study in 742 adolescent and 779 adult pregnant women in Guatemala, Dominican Republic and Uruguay, assessing demographic, social, obstetric, weight gain and BMI at first prenatal control, and  $4 \pm 1$  month post partum. BMI in adults was classified according to WHO recommendations and NCHS/WHO in adolescents. We assessed changes of BMI between the beginning and postpartum time and a logistic model analysis was applied about the risk of having low BMI at postpartum time. At the beginning of pregnancy the prevalence of low weight was higher in adolescent group and the overweight and obesity higher in adults ( $p < 0.001$ ). Weight gain was significantly higher in adolescents at same nutritional BMI, except for low weighted. Adolescents had a significant change in their BMI at postpartum time, showing a tendency to increase weight and a higher prevalence of overweight and obesity ( $p < 0.001$ ). Higher risk of low BMI in postpartum was associated with low prenatal BMI (OR 25,6, CI 12,6 – 52), adolescence (OR 3,3 CI 1,6 – 6,6) and gestational weight gain  $< 300$  g. per week (OR 1,4 CI 1,1 – 3,9). In conclusion adolescent nutritional status was not damaged after pregnancy. The strongest variable associated with postpartum low BMI was BMI which mothers begin pregnancy as equal of adult mothers.

**Key words:** Pregnancy, adolescents, nutritional status, low weight, postpartum maternal BMI.

### INTRODUCCION

El embarazo en la adolescencia es muy frecuente en la región dado que el grupo de 15 a 19 años representa cerca del 20% de las mujeres en edad fértil y que el debut sexual ocurre cada vez con mayor frecuencia en esa etapa (1). El embarazo adolescente es considerado de riesgo obstétrico y perinatal, porque las tasas de morbi-mortalidad maternas y fetales y la prevalencia de peso bajo al nacer son más altas que en mujeres adultas (2-4).

El crecimiento de las adolescentes embarazadas aún no ha cesado, particularmente para aquellas que se encuentran en sus dos primeros años de edad ginecológica, lo que aumentaría hasta los 4 años para otros autores. Esto genera necesidades nutricionales adicionales a la gestación, lo que en situaciones adversas determina una competencia por los nutrientes entre la madre y el feto (5). No existe consenso sobre cuál debiera ser el incremento de peso adecuado en las adolescentes embarazadas, pero muchos autores concuerdan que debe corresponder al extremo superior del rango recomendado para la adulta, teniendo siempre en cuenta el estado nutricional pregestacional (6).

Aunque la adolescencia es una etapa importante del ciclo reproductivo y el embarazo en este período aumenta los

---

Esta investigación fue subvencionada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).

resultados adversos para el niño y la mujer, el conocimiento sobre el tema es limitado y la mayor parte de los estudios se refieren al embarazo en mujeres adultas y sus efectos en el recién nacido. Resulta relevante por lo tanto conocer los factores de riesgo para un deficiente estado nutricional materno, medir si la edad es un factor determinante y evaluar si las consecuencias en la adolescencia son similares a las adultas en iguales condiciones de atención de salud y de nivel socio económico.

Existe escasa literatura que evalúe el estado nutricional posparto de las adolescentes, particularmente en América Latina o sobre el efecto que tiene el embarazo en la situación nutricional. Kac en Brasil y otros autores han demostrado que las mujeres  $\geq 30$  años retienen mayor peso en el período post parto que las más jóvenes (7-10)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las consecuencias que el embarazo tiene sobre el estado nutricional de las mujeres adolescentes en tres países de la región con características diferentes (Guatemala, República Dominicana y Uruguay) y compararlo con un grupo de mujeres adultas. A la vez identificar y cuantificar los factores que aumentan el riesgo de un resultado nutricional adverso en el posparto, de manera de contribuir al desarrollo de intervenciones más apropiadas.

## MATERIAL Y METODOS

Estudio longitudinal, prospectivo, descriptivo e inferencial de una muestra de 742 embarazadas adolescentes (13 a 19 años) y 779 adultas (25 a 34 años) de tres países con características socioculturales diferentes, llevado a cabo entre enero 2002 y octubre 2005. Para la selección de los países se consideró las tasas de embarazo en adolescentes, prevalencia de bajo peso al nacer, tasa de mortalidad infantil y materna, nivel socioeconómico de la población, disponibilidad de registros perinatales y la estructura institucional para facilitar la realización del estudio en el ámbito local. Se seleccionó finalmente la muestra en tres grupos con características étnicas y culturales distintas.

- población urbana de nivel socio económico bajo de la ciudad de Montevideo (Uruguay) que utiliza servicios de salud pública y de la seguridad social;
- áreas suburbanas pobres y áreas rurales de Guatemala; y
- población de bajo nivel socioeconómico de República Dominicana.

Para estimar el tamaño de muestra se consideró una diferencia de 2 puntos en el IMC promedio inicial en embarazadas adolescentes respecto a las adultas, una desviación estándar común equivalente al 25% de los valores promedios, nivel de confianza 0,05 y poder del test 95%. Ello determinó la necesidad de estudiar 196 mujeres en cada grupo y en cada país, y

estimando una pérdida del 20% en el seguimiento se aumentó la muestra a 250 mujeres en cada grupo.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron: edad 10 a 19 años para adolescentes y 20 a 35 años en adultas, embarazo simple, madres sanas sin patologías asociadas, edad gestacional al primer control prenatal  $\leq 14$  semanas, fecha conocida de la última menstruación o fecha de gestación estimada por ecografía, aceptación de participar y firma del consentimiento informado. Se incluyeron todas las madres que cumplían estos criterios no importando su grupo étnico, nivel socio económico y cultural, estado civil, paridad o consumo de tabaco y alcohol.

Los criterios de exclusión fueron: embarazos gemelares y madres con enfermedades diagnosticadas previamente como diabetes, enfermedades tiroideas, colitis ulcerosa, insuficiencia renal, nefrosis, enfermedades malabsortivas, anemias crónicas falciformes, hemolíticas o talasémicas, infecciones por VIH o parasitosis.

El estudio fue sometido a la aprobación ética local y de la Organización Panamericana de la Salud, y se contó con el consentimiento firmado de las participantes, garantizando en todos los casos la confidencialidad de la información.

Se obtuvieron datos al inicio del embarazo ( $\leq 14$  semanas de gestación), al momento del parto y a los 4 meses  $\pm 1$  mes posparto. En la etapa prenatal se aplicó un instrumento con datos sociodemográficos como edad, domicilio, teléfonos personal y de un vecino o familiar, raza, estado civil, tipo de servicio al que concurre, escolaridad, tipo de trabajo que realiza, tipo de vivienda y se realizaron mediciones de peso y altura.

Para el seguimiento se utilizaron equipos capacitados que visitaron diariamente las maternidades para identificar los nacimientos de las madres del estudio, considerando la fecha probable de parto. En esta etapa se registró el peso al último control del embarazo. Las madres que no fueron encontradas en el momento del parto, fueron visitadas en su domicilio donde se les aplicó la encuesta.

A los 4  $\pm 1$  mes posparto se tomaron nuevamente medidas de peso y altura, ubicando a las madres en el centro de salud respectivo. Para aquellas que no fueron encontradas se implementó un equipo de seguimiento que visitó a las pacientes en su hogar y realizó las medidas in situ. En algunos casos las madres fueron trasladadas hasta la ciudad capital para la recolección de los datos. Aquellas madres que habían abandonado el país fueron ubicadas a través de familiares, realizando la entrevista por teléfono y solicitándoles que se pesaran y midieran, para lo que se les brindó instrucciones sobre el procedimiento. Se logró la obtención de estos datos en el tiempo estipulado (4  $\pm 1$  mes posparto).

Se elaboró un manual de operaciones y en cada país los encuestadores y supervisores que participaron del estudio fueron entrenados. Los procedimientos de medición fueron

estandarizados de acuerdo a normas internacionales y se utilizaron balanzas calibradas y tallímetros con control de calidad ISO 9000. Se diseñaron planillas de seguimiento, que fueron registradas por los encuestadores y supervisores, con un plan logístico y seguimiento estricto en cada país. Se realizaron visitas de supervisión a los países para evaluar la calidad de los datos recogidos. Para el caso de República Dominicana se reforzó el seguimiento de pacientes, con equipos de estudiantes avanzados de medicina. Una vez culminada la recolección se tomaron 10 casos en forma aleatoria en cada país y se aplicaron las encuestas nuevamente en domicilio para evaluar la confiabilidad de los datos.

Las encuestas fueron centralizadas en el Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP) donde se realizó digitación de los datos en duplicado por diferentes digitadores, para asegurar su calidad. Se diseñó un software para la detección de inconsistencias, las que se informaron al coordinador de cada país para que rectificaran o ratificaran la información.

La valoración antropométrica se hizo a través del Índice de Masa Corporal (IMC). Para clasificar a las mujeres adultas en el primer control prenatal se utilizó el IMC según los puntos de corte recomendados por la OMS en 1998: bajo peso < 18,5, normal entre 18,5 y 24,9, sobrepeso entre 25,0 y 29,9, y obesidad  $\geq$  a 30. Las adolescentes fueron evaluadas según IMC por edad usando la referencia NCHS/OMS. Se clasificó como bajo peso un valor < percentil 15, normal entre 15 y 84, sobrepeso entre 85 y 95 y obesidad por encima de percentil 95. El peso obtenido antes de las 14 semanas de embarazo se consideró como peso pregestacional, asumiendo que el incremento en esa etapa es menor a 1 kg. La ganancia de peso semanal se calculó dividiendo la diferencia de peso entre el último control ( $\geq$  37 semanas de gestación) y el primer control, por las semanas de gestación transcurridas.

En el análisis estadístico se utilizaron medidas de resumen como promedios y desvíos estándares para las variables continuas, y proporciones para las variables categóricas, analizando las diferencias entre adolescentes y adultas al inicio del embarazo y al posparto. Se subdividió el grupo de adolescentes en  $\leq$  16 años y 17 a 19 años, para observar si existían diferencias al interior del grupo. La mayor parte de las variables tuvieron un comportamiento similar, por lo cual se analizaron los resultados en forma conjunta, comentando las diferencias cuando fue pertinente.

En variables cuantitativas se usó la prueba t-student o Mann-Whitney para muestras independientes, prueba t-student o Wilcoxon para dependientes y ANOVA o Kruskal-Wallis para la comparación de más de dos grupos. Para la asociación de variables cualitativas se usó el test de  $\chi^2$  de Pearson, test de Fisher y Stuart Maxwell para las muestras dependientes. Se usó la regresión logística para evaluar la asociación entre el bajo peso pre - parto y post-parto. En el análisis multivariado

se incluyeron las variables que resultaron significativas en el análisis univariados y que pudieran ser de interés biológico. El IMC bajo al inicio del embarazo, la edad y la ganancia de peso se consideraron en forma dicotómica (IMC bajo vs. normal o alto, adolescentes vs. adultas, ganancia de peso < 300 g/sem. vs.  $\geq$  a 300 g/sem.). El análisis se realizó con los datos de los tres países en conjunto y se consideró el nivel de significación para todos los análisis de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se capturaron 500 madres de Guatemala, 486 de República Dominicana y 535 de Uruguay, completándose la información de las tres entrevistas en el 64,2% de la cohorte de Guatemala, 83,2% de República Dominicana y 93,8% de Uruguay. No se encontraron diferencias significativas en el estado nutricional ni otras variables relevantes entre las madres que permanecieron en la cohorte, de aquellas perdidas durante el seguimiento.

La Tabla 1 presenta las características demográficas y sociales de los dos grupos estudiados, destacando una edad promedio de las adolescentes cercana a los 18 años, 10 años mayor que las adultas. Existen diferencias importantes de las características sociodemográficas entre los países, especialmente en relación a raza, estado civil y escolaridad, aunque sin diferencias significativas en un mismo país, salvo el estado civil en República Dominicana y Uruguay.

El IMC al inicio del embarazo fue significativamente menor en las adolescentes que en las adultas (Tabla 2). Al inicio del embarazo las adolescentes de los tres países tenían aproximadamente 6 kg menos y 2,3 puntos menos de IMC en relación a las adultas ( $p < 0,01$ ). Esta diferencia fue algo mayor en las menores de 16 años en Uruguay y Guatemala (aproximadamente 2 kg menos que las adolescentes de mayor edad) y no así en República Dominicana, tendencia que se mantuvo cuando se controló por paridad (datos no mostrados). La talla en cambio no mostró diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los tres países, aún en las menores de 16 años.

El estado nutricional normal fue el más frecuente en ambos grupos. La prevalencia de bajo peso al inicio del embarazo fue baja, aunque más alta en las adolescentes en los tres países (Tabla 3) e inversamente el sobrepeso y obesidad casi al doble en las adultas ( $p < 0,001$ ).

El incremento promedio de peso fue del orden de 300 gramos semanales, algo inferior a lo recomendado en mujeres de peso normal y sin grandes diferencias en función del estado nutricional inicial (Tabla 4). El incremento fue significativamente mayor en adolescentes de peso normal, sobrepeso, y obesidad con respecto a las adultas, no así en las de bajo peso.

TABLA 1  
Características socio-demográficas de la cohorte estudiadas en cada país

	Guatemala		Republica Dominicana		Uruguay	
	Adolescente n = 236	Adulta n = 264	Adolescente n = 247	Adulta n = 239	Adolescente n = 259	Adulta n = 276
	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE
Edad (años)	17,1 ± 1,1	28,2 ± 2,4	16,9 ± 1,5	28,7 ± 2,7	17,5 ± 1,4	29,1 ± 2,6
Edad del primer embarazo (años)	16,4 ± 1,2	22,2 ± 4,5 *	16,3 ± 1,7	21,1 ± 4,2 *	16,9 ± 1,5	20,9 ± 4,1 *
Años de Estudio	5,7 ± 2,6	7,5 ± 4,1	7,9 ± 2,4	9,4 ± 3,9	7,6 ± 1,8	8,2 ± 2,3
Edad gestac. parto (1)	40,0 ± 1,2	40,0 ± 1,1	39,2 ± 1,6	39,1 ± 2,1	38,5 ± 1,9	38,6 ± 2,0
Raza	%	%	%	%	%	%
Blanca	-	-	7,7	4,2	79,9	77,2
Negra	-	-	14,2	12,1	2,4	3,6
Mestiza	96,6	96,2	77,7	83,7	14,1	14,9
Indígena	3,4	3,8	-	-	-	-
Sin información	-	-	0,4	-	3,6	4,3
p	NS	NS	NS			
Estado Civil						
Casada	57,2	56,4	6,1	18,4	6,6	43,9
Unión estable	35,2	35,2	85,8	77,4	45,9	44,9
Soltera/separada/Viuda	7,6	8,4	8,1	4,2	47,5	11,2
p	NS	< 0,001	< 0,001			
Escolaridad						
Sin escolaridad	3,4	3,5	0,8	1,3	-	-
Primaria incompleta	33,1	24,2	44,5	35,5	4,2	4,0
Primaria completa	63,1	72,3	54,7	63,2	95,8	96,0
Sin información	0,4	-	-	-	-	-
p	NS		NS		< 0,05	

\* Diferencia entre adolescentes y adultas p < 0,001; (1): sólo en recién nacidos vivos

TABLA 2  
Peso, talla e IMC promedio al inicio del embarazo ( $\leq 14$  sem) en adolescentes y adultas de los tres países

Variable	Guatemala			Republica Dominicana			Uruguay		
	Adolescente n = 231	Adulta n = 250	p	Adolescente n = 232	Adulta n = 221	p	Adolescente n = 254	Adulta n = 276	p
	X ± DE	X ± DE		X ± DE	X ± DE		X ± DE	X ± DE	
Peso kg	51,4±7,4	57,6±10,0	*	56,4±10,1	62,0±11,5	*	56,0±10,0	63,0 ±13,0	*
Talla cm	151,0 ±5,2	151,0± 5,7	NS	158,3±6,4	158,0±6,2	NS	158,0 ±6,1	158,8±6,3	NS
IMC	22,6±2,8	25,1±4,0	*	22,5±3,8	24,9±4,4	*	22,6±4,0	24,9±5,0	*

\* < 0,05

TABLA 3  
Estado nutricional según IMC al inicio del embarazo ( $\leq 14$  semanas)  
en adolescentes y adultas de los tres países

Estado nutricional	Guatemala		República Dominicana		Uruguay	
	Adolescente %	Adultas %	Adolescente %	Adultas %	Adolescente %	Adultas %
Bajo Peso	3,9	1,6	9,5	5,9	8,2	2,2
Normal	75,3	50,8	64,9	45,7	70,8	58,9
Sobrepeso	15,6	36,4	15,2	35,7	12,5	24,0
Obesidad	5,2	11,2	10,4	12,7	8,6	14,9
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	< 0,05		< 0,001		< 0,001	

TABLA 4  
Ganancia de peso promedio semanal (g) y total (kg) y peso al nacer según grupo de edad y estado nutricional inicial de la embarazada, en los tres países

Ganancia de peso g/semana n=110	Guatemala		p	República Dominicana		p	Uruguay		p
	Adolescentes n=112 X $\pm$ DE	Adultas n=108 X $\pm$ DE		Adolescentes n=76 X $\pm$ DE	Adultas X $\pm$ DE		Adolescentes n=171 X $\pm$ DE	Adultas n=195 X $\pm$ DE	
IMC	gramos /semana								
Bajo peso	279 $\pm$ 70	353 $\pm$ 38	NS	397 $\pm$ 247	295 $\pm$ 65	<0,01	300 $\pm$ 135	317 $\pm$ 70	NS
Normal	329 $\pm$ 105	301 $\pm$ 87	<0,05	322 $\pm$ 179	299 $\pm$ 170	NS	336 $\pm$ 165	274 $\pm$ 108	< 0,001
Sobrepeso	292 $\pm$ 113	238 $\pm$ 102	<0,05	283 $\pm$ 202	257 $\pm$ 124	NS	369 $\pm$ 123	290 $\pm$ 145	<0,01
Obesidad	239 $\pm$ 80	204 $\pm$ 117	NS	302 $\pm$ 250	221 $\pm$ 143	NS	405 $\pm$ 224	175 $\pm$ 167	< 0,001
Total g	316 $\pm$ 106	267 $\pm$ 103	<0,01	321 $\pm$ 196	271 $\pm$ 148	<0,05	343 $\pm$ 165	264 $\pm$ 132	< 0,001
Total (kg)	11,9 $\pm$ 3,9	10,6 $\pm$ 3,9	<0,05	12,9 $\pm$ 7,5	10,4 $\pm$ 5,3	<0,05	13,3 $\pm$ 5,4	10,8 $\pm$ 5,4	<0,05
Peso al nacer	2990 $\pm$ 445	3011 $\pm$ 548	<0,05	3128 $\pm$ 482	3222 $\pm$ 482	<0,05	3178 $\pm$ 423	3332 $\pm$ 492	<0,05

No hubo cambios significativos en el IMC promedio de las adultas entre el embarazo y el posparto y si en las adolescentes, con un incremento promedio del orden de 0,7 puntos, aunque se observó gran variabilidad individual.

La comparación del estado nutricional entre el primer control prenatal y el posparto se presenta en la Tabla 5, analizando conjuntamente los tres países, evidenciándose cambios significativos en adolescentes y no así en las adultas ( $p < 0,001$ ). En el grupo de las adolescentes cerca de la tercera parte de las que presentaban bajo peso inicial se normalizan en el posparto, la mayor parte de los normales mantuvo su estado nutricional y más del 30% de las que comenzaron con

sobrepeso pasaron a la categoría de obesidad. En el grupo de adultas, la tendencia fue similar, pero no significativa.

De acuerdo a la regresión logística conjunta para los tres países el bajo IMC al inicio del embarazo fue la variable que condicionó en forma más importante el riesgo de tener bajo peso en el posparto (Tabla 6). Otras variables significativas fueron la edad materna y la ganancia de peso, siendo tres veces mayor el riesgo de bajo peso en el posparto de las adolescentes que las adultas y el doble el riesgo cuando la ganancia promedio de peso fue menor a 300 g semanales.

**TABLA 5**  
Evolución del estado nutricional (IMC) de las adolescentes y adultas entre el primer control prenatal y el 4º mes posparto según diagnóstico inicial en los tres países

Adolescentes		Estado nutricional 4º mes posparto			
Estado nutricional 1º control prenatal	n	Bajo peso %	Normal %	Sobrepeso %	Obesidad %
Bajo peso	36	63,9	33,3	-	2,8
Normal	357	6,7	78,2	11,8	3,4
Sobrepeso	68	-	23,5	44,1	32,4
Obesidad	42	2,4	9,5	14,3	73,8
p < 0,001					
Adultas		Estado nutricional 4º mes posparto			
Estado nutricional 1º control prenatal	n	Bajo peso %	Normal %	Sobrepeso %	Obesidad %
Bajo peso	14	42,9	57,1	-	-
Normal	277	3,2	80,9	15,2	0,7
Sobrepeso	154	-	16,9	71,4	11,7
Obesidad	77	-	2,6	24,7	72,7
p NS					

**TABLA 6**  
Modelo de regresión logística multivariado para el riesgo de tener bajo peso en el posparto (IMC), en los tres países

Variable	$\beta$	Odds Ratio	Odds ratio ajustado	p
Bajo IMC 1er control prenatal	3,6	38,5	25,6 (12,6 – 52,0)	< 0,001
Edad < 19 años	1,3	3,7	3,5 (1,7-7,1)	< 0,001
Ganancia de peso < 300 g./semana	0,4	1,5	2,2 (1,1-4,1)	< 0,05

n =928

Prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow p 0,25

## DISCUSION

Los resultados muestran que el embarazo no tiene consecuencias negativas sobre el estado nutricional posparto de las propias mujeres adolescentes, medidas a través del IMC bajo en la etapa posparto. Dado que estos resultados se obtuvieron, en madres que recibieron similar atención prenatal, se podría concluir que ambos grupos son comparables con relación a posibles variables de confusión, considerándolos por separado. Ambos grupos fueron captados y seguidos en los mismos centros de salud lo que implica igual oferta de atención prenatal, parto y posparto (11).

El factor condicionante que se correlacionó más fuerte-

mente con el bajo IMC en el posparto fue el estado nutricional deficitario al inicio del embarazo. Estos resultados concuerdan con los estudios de Kac que muestran la relación entre la retención de peso posparto y los factores relacionados. Los estudios realizados en mujeres adultas también muestran el estado nutricional pregestacional como la variable más asociada al IMC posparto (6,12-16). Los datos de este estudio muestran que el embarazo en adolescentes impone un mayor riesgo nutricional para la madre, pero que este aumento no es debido en primer lugar a la edad sino al bajo peso al inicio de la gestación.

Un factor que podría explicar estos resultados es la diferente ganancia de peso. Si bien existían diferencias en el peso

corporal al inicio del embarazo, el incremento fue mayor en las adolescentes, disminuyendo las diferencias del IMC entre ambos grupos en el posparto (13,17,18).

El aumento de peso no mostró el comportamiento esperado dependiente del estado nutricional con que comenzaron las adolescentes (19). A su vez, el incremento fue menor a las recomendaciones internacionales, lo que plantea la nueva pregunta de cuál es el incremento óptimo en adolescentes para obtener resultados nutricionalmente aceptables, ya planteada por otros autores (20). Este tema debería ser objeto de nuevas investigaciones en grupos de adolescentes con diferentes características, que permitan establecer curvas de aumento de peso para las embarazadas adolescentes en diferentes poblaciones, según edad y peso previo.

El IMC es recomendado por la OMS como un indicador básico para evaluar el estado nutricional. Sin embargo una de las limitaciones de nuestro estudio radica en que se analizaron solamente variables antropométricas, sin considerar el consumo de energía ni de nutrientes críticos, que permiten una comprensión más integral de la relación del embarazo adolescente con la nutrición. La mayoría de los investigadores que han estudiado adolescentes concuerdan en que este grupo tiene dietas pobres en vitaminas como A, E, folato y minerales como hierro, zinc, magnesio y calcio (21-23).

Los estudios de Scholl (5) y Frisancho (14), y más recientemente de Rah y cols. (24) sobre el estado nutricional y el crecimiento de las madres adolescentes no concuerdan con nuestros resultados. Ellos sugieren que las adolescentes jóvenes continúan creciendo durante el embarazo, lo que daría lugar a una competencia por los nutrientes entre la madre y el feto y con implicancias en el estado nutricional materno. Algunos de estos estudios plantean que esta competencia podría extenderse al período de lactancia. Parte de la discordancia podría deberse a que fueron estudios realizados en poblaciones más pobres que las de la presente investigación y con un porcentaje de déficit mayor que alcanzaron en algunos casos al 40%. Estos autores refieren una disminución del IMC en el posparto que no fue encontrada en nuestro estudio (25-27).

El principal factor identificado que eleva el riesgo de bajo IMC al posparto es el bajo IMC pregestacional, que es más fácilmente modificable que la edad. Cuando una adolescente recibe una cantidad y calidad de controles adecuados desde antes de la concepción y luego durante la gestación, se pueden obtener resultados similares a las adultas (28-30). Esto implica la promoción de una buena nutrición en el ciclo vital, una captación temprana del embarazo y una mejor atención en los controles en salud intensificando las acciones en alimentación y nutrición.

Dado que el incremento de peso debe ser mayor al de las adultas, y que no se ha encontrado una gran diferencia de acuerdo al estado nutricional con la que comenzaron, se considera útil y necesario nuevos estudios que colaboren en la

construcción de curvas de peso de referencia para la atención más adecuada y rigurosa de las adolescentes embarazadas, las cuales no existen en la actualidad.

## REFERENCIAS

1. Deslisle H. Nutrition in adolescence: Issues and challenges for the health sector. Geneva: WHO 2005; 92 4 159366 0. [www.who.int/child-adolescent-health/publications/ADH/Discussion\\_papers.htm](http://www.who.int/child-adolescent-health/publications/ADH/Discussion_papers.htm)
2. Otterblad P, Cnattingius S, Haglund B. Teenage pregnancies and risk of late fetal death and infant mortality. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999; 106:116–21.
3. DuPlessis H, Bell R, Richards T. Adolescent pregnancy: understanding the impact of age and race on outcomes. *J Adoles. Health.* 1997; 20:187–97.
4. American Academy of Pediatrics, Committee on Adolescence. Adolescent pregnancy-current trends and issues: 1998. *Pediatrics.* 1999;103 :516 –520
5. Scholl TO, Hediger, ML. Weight Gain, Nutrition, and pregnancy outcome: findings from the Camden study of teenage and minority gravidas. *Seminars in Perinatology* 1995;19: 171–181.
6. Rees J, Lederman S, Kiely J. Birth weight associated with lowest neonatal mortality: infants of adolescent and adult mothers. *Pediatrics* 1996; 98:1161-66
7. Thame M, Trotman H, Osmond C, Fletcher H, Antoine M. Body composition in pregnancies of adolescents and mature women and the relationship to birth anthropometry. *Eur. J. Nutr.* 2007, 61(1):47-53.
8. Kac G, Benício MH, Velásquez – Meléndez G, Valente JG. Nine months postpartum weight retention predictors for Brazilian women. *Public Health Nutr.* 2004;7: 621-8.
9. Kac G, Benício M, Velásquez – Meléndez, Valente J, Struchiner C. Breastfeeding and postpartum weight retention in a cohort of Brazilian women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79(3):487-493
10. Kurz K. Health consequences of Adolescent Childbearing in Developing Countries ICRW working paper N 4, 1997
11. Koletzko B, Aggett PJ, Bindels JG, Bung P, Ferre P, Gil A, Lentze MJ, Roberfroid M, Strobel S. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. 1998, 80 Suppl 1: S5-45.
12. Fujimori E, de Oliveira IM, de Cassana LM, Szarfarc SC. Estado nutricional del hierro de gestantes adolescentes, Sao Paulo, Brasil. *Arch Latinoamer Nutr* 1997; 49: 305 – 10
13. Frisancho R, Matos J, Flegel P. Maternal nutritional status and adolescent pregnancy outcome. *Am Journal Clin Nutr* 1993;38:739-746
14. L. H. Allen, M. S. Lung'aho, M. Shaheen, G. G. Harrison, C. Neumann and A. Kirksey Maternal body mass index and pregnancy outcome in the nutrition collaborative research support program. 2009. <http://www.unu.edu/unupress/food2/UID10E/uid10e0j.htm>.
15. Dubois S, Coulombe C, Pencharz P, Pinsonneault O, Duquette MP. Ability of Higgins Nutrition Intervention Program to improve adolescent pregnancy outcome. *J Am Diet Assoc* 1997;97:871-8.

16. De Olivera Y, De Cassana L. Estado nutricional de gestantes adolescentes en Sao Paulo, Brasil. *Arch Latinoamer Nutr* 1997; 47:305-310
17. Joseph NP, Hunkali KB, Wilson B, Morgan E, Cross M, Freud KM. Pre-pregnancy body mass index among pregnant adolescents: gestational weight gain and long – term post partum weight retention. *Pediatr Adoles Gynecol.* 2008; 21 :195-200.
18. Herman AA, Yu KF. Adolescent age at first pregnancy and subsequent obesity. *Paediatric Perinat Epidemiol* 1997;11 Suppl 1:130– 41
19. Bolzán A, Uimarey L. Relación entre el Índice de masa corporal durante la gestación en embarazadas adolescentes y adultas, indicadores de crecimiento fetal y retardo del crecimiento intrauterino. La Costa, Argentina 1999. *Arch Latinoamer Nutr* 2001; 51: 145- 150
20. World Health Organization. Physical status. The use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series number 854, Geneva 1995.
21. Heald FP, Gong E. Diet, nutrition and adolescence. In Skills MF, Olson JA, Shike M, Ross AC Eds. *Modern nutrition in health and disease.* Williams and Wilkins, Maryland, USA, 1999.
22. Eisentein E. Chronic undernutrition during adolescence. *Am NY Acad Sci* 1997; 28:138–61
23. Dos Anjos LA, de Veiga GV, RuganiRibeiro I. Distribuição dos valores do índice de massa corporal da população brasileira até 25 anos. *Am J Public Health* 1998; 3:164–73.
24. Rah JH, Christian P, Shamim AA, Arju UT, Labrique AB, Rashid M. Pregnancy and lactation hinder growth and nutritional status of adolescent girls in rural Bangladesh. *J. Nutr.* 2008; 138: 1505-11.
25. Young J., Trotman H., Thame M. The impact of antenatal care on pregnancy performance between adolescent girls and older women. *West Indian Med. J.* 2007; 56: 414-20
26. Wort UU, Warsame M., Brabin BJ. Birth outcomes in adolescent pregnancy in an area with intense malaria transmission in Tanzania. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006; 85: 949-54
27. Nasreen SA, Haque MM, Hasan MR. Pregnancy outcome in adolescent and adult – a case comparison study. *Mymensingh Med J.* 2006; 15: 15-21.
28. Lira Plascencia J, Oviedo Cruz H., Zambrana Castañeda M., Ibarüngoitia Ochoa F., Ahued R. Perinatal implications of pregnancy in adolescent women. *Ginecolol Obstet Mex.* 2005; 73: 407-14.
29. Al-Ramahi, Saleh S. Outcome of adolescent pregnancy at a university hospital in Jordan. *Arch Gynecol. Obstet.* 2006; 273: 207-10.
30. Joseph NP, Hunkali KB, Wilson B, Morgan E, Cross M, Freund KM Pre-pregnancy body mass index among pregnant adolescents: gestational weight gain and long-term post partum weight retention. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2008; 21: 195-200.

Recibido: 19-03-2009

Aceptado: 11-05-2009

## Caracterización de un modelo en ratas, útil en el estudio de las consecuencias nutricionales de la diarrea

*Olga Carolina Aristimuño, Anna María Cioccia, Marlén Gutiérrez, Diamela Carías y Patricio Hevia*

Laboratorio de Nutrición. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

**RESUMEN.** La mortalidad por diarrea ocurre casi en su totalidad en los países subdesarrollados. Esto, se debe fundamentalmente a las malas condiciones sanitarias que los caracterizan. En consecuencia, mientras estas condiciones no cambien, en estos países, el enfoque en el caso de las enfermedades diarreicas, debe concentrarse en el tratamiento. Un aspecto importante del tratamiento de la diarrea infantil es evitar la desnutrición que causa y en consecuencia, la alimentación apropiada durante la diarrea es de vital importancia. De acuerdo con esto, se estudió un modelo de diarrea en ratas que se basa en reemplazar parte del almidón de la dieta por lactosa lo cual permite obtener diarreas de severidad variable, que reproducen los efectos nutricionales de la diarrea infantil. Se estudiaron 5 niveles de reemplazo: 0, 30, 50, 70 y 90% y se realizaron colecciones fecales entre los días 1-3, 4-6, 11-13 y 18-20 del experimento. El reemplazo causó un aumento en la masa fecal que fue proporcional al nivel de sustitución. La masa fecal fue máxima durante la primera semana y disminuyó en las semanas subsiguientes. Se observó una reducción en la digestibilidad aparente de la proteína, grasa, carbohidratos y energía que fue proporcional a la severidad. La diarrea además estuvo asociada con una reducción en el consumo de alimento que en conjunto con la disminución en la absorción causaron un importante déficit de crecimiento. Este modelo reproduce los efectos negativos de la diarrea sobre la nutrición infantil y puede ser servir en la preselección de los alimentos más apropiados para la alimentación durante la diarrea.

**Palabras clave:** Severidad diarrea, ratas, concentración de lactosa, consumo alimento, crecimiento, absorción macronutrientes y energía.

### INTRODUCCION

A partir de los años 70, la tasa de mortalidad asociada con la diarrea, empezó a declinar progresivamente y actualmente la mortalidad infantil asociada con este problema gastrointestinal se ha reducido en un 50% a 70%. (1-3). Esta reducción se ha debido esencialmente a la difusión del uso de las soluciones de rehidratación oral (4) y a un cambio notable en el tratamiento nutricional, que reemplazó la popularizada práctica de eliminar la alimentación durante el episodio diarreico por la inclusión de

**SUMMARY. Characterization of a rat model useful for studying the nutritional consequences of diarrhea.** Due to poor sanitary conditions, total global diarrhea mortality occurs almost exclusively in underdeveloped countries. Since, in these countries, sanitation is greatly overlooked, in the case of diarrheal disease, the emphasis must be oriented to treatment rather than prevention. An important aspect in the treatment of diarrheal disease is to avoid the malnutrition it causes and therefore, proper feeding during and after the diarrheal episode is a crucial issue. Accordingly, we studied a diarrhea rat model, based on the replacement of part of the dietary corn starch by lactose which produces diarrhea of increasing severity that reproduces the negative nutritional effects of diarrhea. Five levels of replacement (0, 30, 50, 70 y 90%) were studied and feces were collected on day 1-3, 4-6, 11-13 and 18-20 of the experiment. This resulted in an increment in fecal mass (diarrhea) which was proportional to the replacement level; it reached its maximum during the first week and declined thereafter. During the same period, reductions on the apparent digestibility of the dietary protein, fat, carbohydrates and energy were detected. These reductions were proportional to the severity of diarrhea and occurred in conjunction with a reduction in food intake. These two conditions resulted in a deficient growth which was also proportional to the severity of the lactose induced diarrhea. This model reproduces the negative effects that diarrhea has on infantile nutrition and it may be useful in pre-selecting the most appropriated foods to be tested in human studies. **Key words:** Diarrheal severity, rats, lactose concentration, food intake, growth, macronutrients and energy absorption.

alimentos hipotónicos (5), inmediatamente después de corregir los desbalances hídricos y electrolíticos.

Sin embargo, a pesar de que las soluciones de rehidratación oral por su demostrada efectividad en corregir los problemas de deshidratación y su fácil administración al paciente diarreico, se consideran como uno de los avances más importantes en la medicina del siglo XX (1,4), su aplicación sólo evita la deshidratación, que es la causante de la mortalidad asociada con la diarrea, pero no afecta las causas que predisponen a la diarrea. Estas causas, de acuerdo con la OMS están relacionadas en aproximadamente un 94% a factores de riesgo ambiental, como son el consumo de agua no potable, así como el saneamiento y la higiene insuficientes (6). Por esta razón, a pesar del descenso en mortalidad, la morbilidad

---

Financiado por el Grupo de Nutrición y Bioquímica del Decanato de Investigación y Desarrollo de la Universidad Simón Bolívar.

asociada con la diarrea no ha decrecido sustancialmente, (2,3) manteniéndose en promedio en el mundo, entre 2.6 a 3.5 millones de episodios por año, en niños menores de 5 años (2,7).

Las enfermedades diarreicas están estrechamente vinculadas con la desnutrición ya que producen respuestas metabólicas que pueden aumentar los requerimientos de nutrientes en un momento en el que su disponibilidad se encuentra limitada principalmente por una reducción en el consumo de alimentos y una disminución en su absorción y retención. (8-10). Por otra parte, la desnutrición, aumenta la duración de los episodios diarreicos así como la intensidad de los mismos y predispone a que la diarrea aguda evolucione hacia formas de diarrea más difíciles de tratar como es la diarrea persistente (11). Esto ocurre debido a que la desnutrición reduce la capacidad inmunitaria y modifica negativamente la mucosa intestinal con lo que disminuye la capacidad de absorber los nutrientes consumidos, agravando la desnutrición (11). Por esta razón se ha propuesto, que la diarrea y la malnutrición ejercen efectos sinérgicos uno sobre el otro (3, 8,11-13) y que esta sinergia, transforma a la diarrea en la principal causa de desnutrición.

El hecho de que la diarrea cause desnutrición, es importante porque se ha establecido que los niños desnutridos tienen un peor pronóstico para todas las enfermedades infecciosas y al mismo tiempo, se estima que la desnutrición es responsable de la mitad de la mortalidad infantil en el mundo; en consecuencia, es el factor de riesgo más importante de mortalidad infantil (6,14).

Las consideraciones anteriores, señalan por una parte, que mientras no se corrijan las condiciones sanitarias, los episodios de diarrea no van a disminuir. Por otra parte indican, que aunque la utilización de las soluciones de rehidratación oral logran evitar la mortalidad en estos niños, su uso no reduce el riesgo de desnutrición, que es lo que predispone al niño que logró superar los problemas de deshidratación, a una alta mortalidad por enfermedades infecciosas en general (14). Estos argumentos señalan que en las condiciones actuales, el tratamiento del niño con diarrea debe considerar como uno de sus objetivos más importantes evitar la desnutrición. Para ello es fundamental determinar cual es la alimentación más apropiada para este niño tanto durante el episodio diarreico como durante el período de recuperación.

Concientes de esta situación, así como de las dificultades, técnicas, éticas y económicas asociadas con la realización de estudios en niños con diarrea (9), en el Laboratorio de Nutrición de la Universidad Simón Bolívar, se han venido estudiando modelos de diarrea no infecciosa en ratas, útiles para estudiar los efectos negativos que tiene la diarrea sobre la nutrición. De éstos, el uso de lactosa como agente promotor de diarrea en ratas es uno de los que ha tenido más éxito.

La diarrea inducida con lactosa en ratas reproduce muchos de los efectos nutricionales negativos, que provoca la diarrea en

los niños. Así, cuando la lactosa contenida en la dieta, reemplaza aproximadamente la mitad de los carbohidratos dietarios, se logra una diarrea cuya severidad se asemeja a la de una diarrea persistente en niños (9). De acuerdo con esto, la diarrea producida con lactosa en estas condiciones, resulta en reducciones en la absorción de los macronutrientes que fluctúan entre un 20% a 25% tal como ocurre en la diarrea persistente infantil, mientras que en los dos primeros días de un episodio de diarrea aguda esta reducción puede alcanzar a un 40% (9).

En base a lo anterior, el objetivo del presente estudio, fue determinar en ratas con diarrea producida con lactosa si la severidad de la diarrea, así como sus efectos sobre la disponibilidad de los macronutrientes y de la energía dietaria dependían de la concentración de lactosa en la dieta y en consecuencia, si aumentando la concentración de lactosa se podían alcanzar reducciones en la absorción de los macronutrientes dietarios similares a las observadas en la diarrea aguda infantil. Para lograr este objetivo, se prepararon dietas en las cuales se reemplazó el 30%, 50%, 70% y 90% del almidón por lactosa. Estas dietas se les ofrecieron a ratas durante 21 días, con determinaciones de consumo y crecimiento interdiarios y colecciones de heces seriadas que permitieron determinar la severidad de la diarrea así como la disponibilidad de los macronutrientes consumidos a medida que transcurría el tiempo de experimentación.

## MATERIALES Y METODOS

Para lograr el objetivo de este estudio, se utilizaron cuarenta ratas machos de la cepa "Sprague Dawley", con un peso comprendido entre 69 y 78 gramos. Luego de tres días de acondicionamiento con una dieta control que cubría todos los requerimientos de la rata (15), estos animales se distribuyeron al azar en cinco grupos de ocho ratas cada uno. El primer grupo se alimentó con dieta control, que contenía 73,7g de almidón de maíz (Paddock CA. Caracas Venezuela) por 100g de dieta (16), mientras que a los cuatro grupos restantes se les ofreció la misma dieta, pero parte del almidón de maíz fue reemplazado por lactosa (a-lactose monohydrate, USP.Harlan-Teklad Madison Wisconsin USA. Catálogo No. 50640), de manera que la proporción de lactosa y almidón en los grupos 2, 3, 4 y 5 fue de (lactosa:almidón) 30:70, 50:50, 70:30 y 90:10 respectivamente.

Los cinco grupos de ratas consumieron las dietas asignadas así como el agua "ad libitum" por un período de 21 días. Se realizaron colecciones de heces y orina de tres días en los periodos comprendidos entre los días 1-3, 4-6, 11-13 y 18-20 del experimento, para determinar la severidad de la diarrea, así como la absorción aparente y neta de la energía, y los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteína) contenidos en la dieta. Al mismo tiempo se registró el peso corporal y el

consumo de alimento en los diferentes períodos de recolección. Durante todo el experimento, las ratas se mantuvieron individualmente en jaulas metabólicas que permitieron la separación de las heces y la orina. Para facilitar esta separación, a las jaulas se les adaptó una rejilla fina (20 mallas) de acero inoxidable. Estas rejillas se pesaron antes y después de la recolección para la determinación del peso fecal húmedo. Luego, las rejillas con las heces húmedas, se secaron en una estufa a 80°C hasta peso constante para la determinación del peso fecal seco.

Se determinó el contenido proteico (Nx6.25) en las dietas y heces utilizando un método colorimétrico (17). La grasa total se determinó en dietas y heces por el método de Bligh y Dyer modificado (18). La energía bruta en dietas, y heces se determinó utilizando un calorímetro adiabático Parr-124. Los carbohidratos en dieta y heces fueron estimados por diferencia como se indica a continuación: A la energía bruta contenida en la dieta y las heces se le restó la energía de las proteínas y las grasas. La energía presente en las proteínas de las dietas o heces se calculó como su contenido de nitrógeno (g x 6,25) y esto se multiplicó por 5,56 Kcal/g que representa el valor calórico bruto de las proteínas. En el caso de las grasas, los gramos de grasa contenidos en las dietas y las heces se multiplicaron por el valor energético bruto de las grasas que es 9,34 Kcal/g. Al restar de la energía bruta total contenida en las dietas o las heces, las energías presentes en las proteínas y grasas de las mismas, queda un remanente que corresponde a la energía presente en los carbohidratos. Dividiendo este remanente energético por la energía bruta de los carbohidratos (4,15 Kcal/g), se obtienen los gramos de carbohidratos presentes en las dietas o las heces.

**Absorción aparente.** Se calculó aplicando la siguiente fórmula

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

Absorción neta. Se calculó usando la siguiente formula.

$$\text{Absorción neta (g)} = \text{Consumo (g)} - \text{Pérdida en heces (g)}$$

En ambas ecuaciones el consumo y las pérdidas fecales se refieren a los medidos en cada recolección de tres días en cada una de las ratas.

### Análisis estadístico

Para la interpretación de los resultados se utilizó el análisis de varianza y para algunas variables se aplicó un análisis de correlación y regresión. En el caso en que las variables eran independientes del tiempo experimental, como las obtenidas al finalizar el experimento se utilizó análisis de varianza de una vía. Sin embargo, en el caso de variables medidas a

diferentes tiempos (Figuras 1-6) se utilizó el análisis de varianza de dos vías. En todos los casos el nivel para significancia estadística se fijó en 5% y cuando hubo efectos significativos se utilizó el método de los rangos múltiples de Duncan para detectar diferencias entre las medias. El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 12.

## RESULTADOS

### Consumo y crecimiento

La Tabla 1 muestra el consumo de alimento y lactosa así como el crecimiento acumulado total, observado en las ratas estudiadas durante los 21 días que duró el experimento. La Tabla señala que las ratas que consumieron la dieta en la que el nivel de reemplazo de los carbohidratos dietarios por lactosa fue de 30%, consumieron y crecieron tanto como las ratas asignadas a la dieta sin lactosa. Sin embargo, reemplazos mayores al 30%, estuvieron asociados con una disminución progresiva e importante del consumo y del crecimiento. La Tabla 1 también muestra que en los grupos de ratas que consumieron las dietas con los más altos niveles de reemplazo (70 y 90%) hubo una mortalidad que alcanzó a un 25%. Asimismo, se observa que el consumo neto de lactosa en estos dos grupos fue similar pero el crecimiento fue menor en las ratas con un 90% de reemplazo.

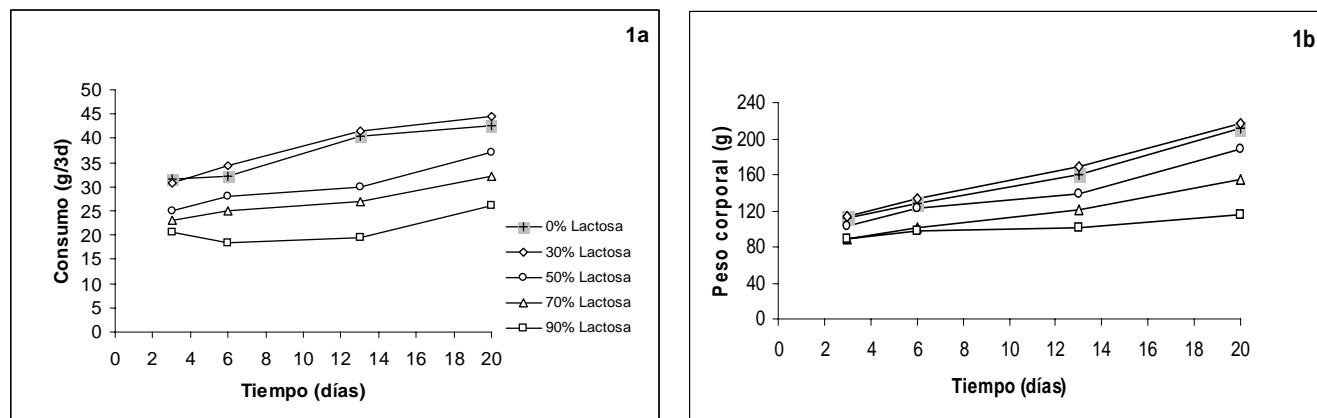
La Figura 1 muestra las variaciones temporales del consumo (1a) y crecimiento (1b) en las ratas estudiadas. Se observa que en las ratas que consumieron las dietas sin lactosa (control) o con un 30% de reemplazo, tanto la ingesta de alimento como el crecimiento no alcanzaron diferencias significativas y aumentan linealmente con el tiempo experimental, mientras que en las ratas asignadas a las dietas con mayores niveles de lactosa, el consumo y el crecimiento fueron menores, y se mantuvieron más o menos constantes hasta el día 13 para luego aumentar ligeramente a partir de ese día. El análisis de varianza mostró un efecto significativo tanto de la lactosa como del tiempo sobre las variables independientes consumo y crecimiento. Esto significa que la inclusión de lactosa en la dieta redujo el consumo y el crecimiento mientras que con el progreso del tiempo experimental, aumentaron ambas variables. Sin embargo, el análisis de varianza, detectó una interacción lactosa-tiempo significativa, indicando que el efecto negativo de la lactosa sobre el consumo y el crecimiento se atenúa progresivamente con el tiempo experimental y eventualmente podría anularse. Esto ocurriría más rápidamente en las ratas asignadas a las dietas con menores niveles de reemplazo. Sin embargo, a pesar de esta tendencia, la Figura 1 muestra que, durante todo el periodo experimental, las ratas asignadas a las dietas con niveles de reemplazo mayores al 30% mantuvieron un déficit importante del consumo y el crecimiento.

TABLA 1  
Consumo, crecimiento y mortalidad en ratas que consumieron dietas con concentraciones crecientes de lactosa durante 21 días

	Lactosa dietaria (%) <sup>1</sup>				
	0	30	50	70	90
Peso inicial(g)	75.7±6.1 <sup>a</sup>	77.1±9.4 <sup>a</sup>	73.8±11.0 <sup>a</sup>	70.8±10.1 <sup>a</sup>	76.7±8.4 <sup>a</sup>
Peso final(g)	212.1±12.9 <sup>a</sup>	216.3±35.4 <sup>a</sup>	187.9±29.2 <sup>b</sup>	154.5±20.1 <sup>bc</sup>	116.3±23.2 <sup>c</sup>
Crecimiento	136.4±13.1 <sup>a</sup>	139.2±28.3 <sup>a</sup>	114.1±21.0 <sup>b</sup>	83.7±13.3 <sup>c</sup>	39.6±15.8 <sup>d</sup>
Consumo alimento(g)	303.9±23.3 <sup>a</sup>	294.1±45.6 <sup>a</sup>	242.8±31.2 <sup>b</sup>	207.1±25.9 <sup>bc</sup>	168.1±22.6 <sup>c</sup>
Consumo lactosa(g)	0	88.2±13.3 <sup>a</sup>	121.4±14.8 <sup>b</sup>	145.0±17.5 <sup>c</sup>	151.3±19.8 <sup>cd</sup>
Mortalidad (n)	0	0	0	2	2
Número ratas (n)	8	8	8	6	6

1. Porcentaje de reemplazo de los carbohidratos de la dieta (almidón de maíz) por lactosa. Ver Tabla 1. La tabla muestra la media ± la desviación estándar del número de ratas mostradas en la tabla. Los resultados se analizaron usando ANOVA de una vía. Las medias con letras (superíndices) diferentes son diferentes ( $p < 0.05$ ). La mortalidad detectada en las ratas que consumieron las dietas con 70% y 90% lactosa ocurrió durante la segunda y tercera semana del experimento. Sin embargo, los registros de crecimiento y consumo de estas ratas no se incluyeron en la tabla.

FIGURA 1  
Consumo de alimento y peso corporal al final de cada período de recolección en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón dietario por lactosa



Los símbolos muestran el consumo (1a) y el peso corporal (1b) medidos al finalizar cada una de las cuatro recolecciones fecales de tres días y que terminaron los días 3, 6, 13 y 20. Cada símbolo representa el promedio de 8 ratas a excepción de los grupos asignados a las dietas con 70% y 90% de reemplazo que debido a la mortalidad que produjeron, tenían sólo 6 ratas. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo así como una interacción tiempo x lactosa significativa en ambos casos. La comparación de las medias indicó que los consumos y pesos corporales de las ratas que consumieron la dieta con 30% de reemplazo fueron iguales a los de las que consumieron la dieta sin lactosa mientras que reemplazos mayores resultaron en consumos y pesos corporales progresivamente menores ( $p < 0.05$ ).

### Masa fecal y diarrea

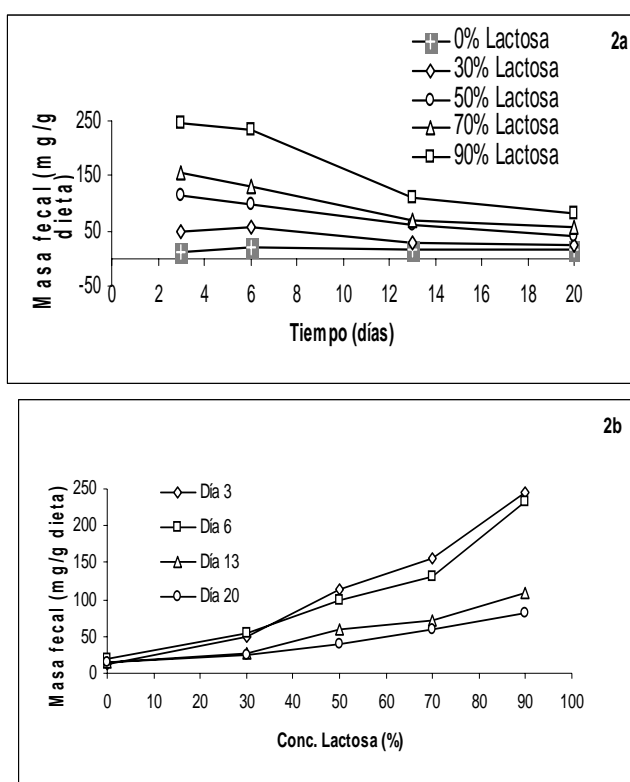
La Figura 2a muestra la masa fecal excretada por las ratas controles (0% Lactosa) y por las ratas que consumieron las dietas con concentraciones crecientes de lactosa, durante los cuatro períodos de recolección fecal realizados durante el experimento. Debido a que la producción fecal depende del consumo de alimento, y que la inclusión de lactosa en la dieta produjo una reducción en el consumo de la misma, la masa fecal se expresó en función de la dieta consumida (mg heces/

g dieta consumida) durante el correspondiente período de recolección. La figura señala que comparadas con las ratas que no consumieron lactosa (0% Lactosa), la cantidad de heces de las que consumieron este disacárido, fueron mayores en todos los períodos de recolección indicando que tenían diarrea. Adicionalmente, la misma figura muestra que la severidad de la diarrea aumentó con el nivel de reemplazo del almidón por lactosa y que en todos los grupos que consumieron las dietas con lactosa, la diarrea disminuyó a medida que aumentaba el

tiempo de exposición a estas dietas. Así, las excreciones fecales medidas, durante los primeros tres días de recolección (días 1,2 y 3 del experimento), en las ratas que consumieron las dietas con 30%, 50%, 70% y 90% de reemplazo del almidón por lactosa fueron acuosas y 4, 9, 13 y 19 veces mayores que la medida en las ratas controles respectivamente. En contraste, durante el último período de recolección (días 18,19 y 20 del experimento), la severidad de la diarrea se redujo, con lo cual, la diferencia entre el grupo control y los experimentales alcanzó a sólo 1.7, 2.7, 4.1 y 5.8 respectivamente.

FIGURA 2

Efecto del tiempo y de la concentración de lactosa sobre la severidad de la diarrea producida por el reemplazo de parte de los carbohidratos dietarios por lactosa



Las Figura 2a y 2b muestran las variaciones en la severidad de la diarrea con el progreso del tiempo y con el nivel de reemplazo respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo así como una interacción tiempo x lactosa significativa. La comparación de las medias indicó que con excepción de las recolecciones de las ratas que consumieron la dieta con 30% de reemplazo realizadas durante las semanas 2 y 3 del experimento, las masas fecales de las ratas que consumieron lactosa siempre fue mayor a las de las ratas que no la consumieron (0% lactosa).

La Figura 2b, ilustra mejor el efecto del tiempo sobre la magnitud de la masa fecal medida en las ratas estudiadas. La figura confirma que al aumentar la concentración de lactosa en la dieta aumenta progresivamente la masa fecal excretada durante todos los períodos de recolección fecal. Sin embargo, este aumento fue substancialmente mayor durante la primera semana del experimento (curvas correspondientes a las recolecciones que terminaron los días 3 y 6) que durante la segunda semana (curvas correspondientes a las recolecciones que terminaron los días 13 y 20). Así, durante esta segunda semana, la masa fecal excretada por las ratas asignadas a la dieta con 30% de reemplazo de almidón por lactosa fue similar a las del grupo sin lactosa y las heces de las ratas del grupo con 50% de reemplazo ya no eran acuosas sino pastosas. Este cambio en la consistencia fecal estuvo asociado con un menor contenido de humedad de las heces. Durante este período, se observaron heces acuosas sólo en algunas ratas del grupo con 70% de reemplazo y en la mayoría de las ratas del grupo con 90% de reemplazo. La disminución en la severidad de la diarrea con el tiempo de exposición a las dietas con lactosa se hizo aun más evidente al finalizar la tercera semana del experimento. El análisis estadístico mostró resultados significativos para los dos efectos principales estudiados: lactosa y tiempo experimental así como una interacción entre ellos. Los datos mostrados en la Figura 2, indican que la lactosa dietaria produce una diarrea dosis dependiente cuya severidad disminuye con el tiempo. La interacción lactosa-tiempo indica que el tiempo modifica el efecto de la lactosa de tal manera que si el experimento se prolongara más allá de 20 días, probablemente la lactosa perdería completamente su efectividad en producir diarrea.

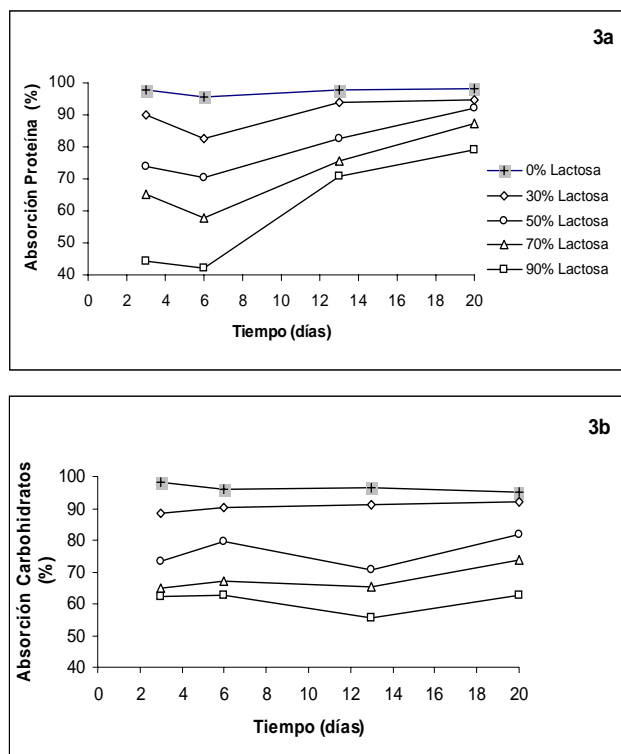
**Absorción aparente de los macronutrientes y de la energía de la dieta**

La Figura 3a muestra las variaciones en la absorción aparente de la proteína dietaria asociadas con el incremento en el nivel de reemplazo del almidón dietario por lactosa, medida en la primera semana de recolección (días 3 y 6 en el gráfico), así como al finalizar la segunda (día 13) y la tercera semana (día 20) del experimento. El gráfico señala que en general, comparadas con las absorciones medidas en las ratas asignadas a la dieta sin lactosa, las de las ratas que consumieron lactosa fueron menores y que las absorciones más bajas ocurrieron durante la primera semana del experimento y luego aumentaron en las semanas siguientes. Así, en el caso de la absorción de la proteína, se aprecia que en el grupo de ratas asignadas a la dieta con 90% de reemplazo, la absorción aparente del nitrógeno medido durante la primera semana fue de aproximadamente 40% mientras que al finalizar la segunda llegó casi a 70% y supero al 70% durante la tercera semana. El análisis estadístico detectó un efecto significativo para la lactosa y el tiempo y también una interacción significativa

entre estas dos variables. Esto señala, que la lactosa dietaria y la diarrea que causa, provocan una reducción en la absorción aparente de la proteína, que es proporcional al nivel de reemplazo del almidón por lactosa y que esta reducción disminuye con el tiempo. La interacción indica que el tiempo experimental modifica el efecto de la lactosa, de manera que podría eventualmente anularlo, si el experimento se prolongara. Como el principal efecto de la lactosa fue producir diarrea y el del tiempo, disminuir su severidad, las variaciones temporales en la digestibilidad aparente de la proteína detectada en estas ratas, se atribuyen a diferencias en la severidad de la diarrea que experimentaron.

FIGURA 3

Absorción aparente de la proteína y de los carbohidratos dietarios en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón por lactosa



Las Figuras 3a y 3b muestran las variaciones en la absorción aparente de la proteína y de los carbohidratos dietarios respectivamente. El ANOVA de dos vías en el caso de la proteína mostró efectos significativos para la lactosa, para el tiempo y una interacción lactosa x tiempo significativa. En el caso de los carbohidratos hubo un efecto significativo sólo para la lactosa. La comparación de medias indicó que las absorciones de la proteína o los carbohidratos medidas en las ratas que consumieron la dieta sin lactosa fueron mayores que las de las ratas que consumieron este carbohidrato en todos los períodos de recolección. Para más detalles ver las notas al pie de la Figura 1.

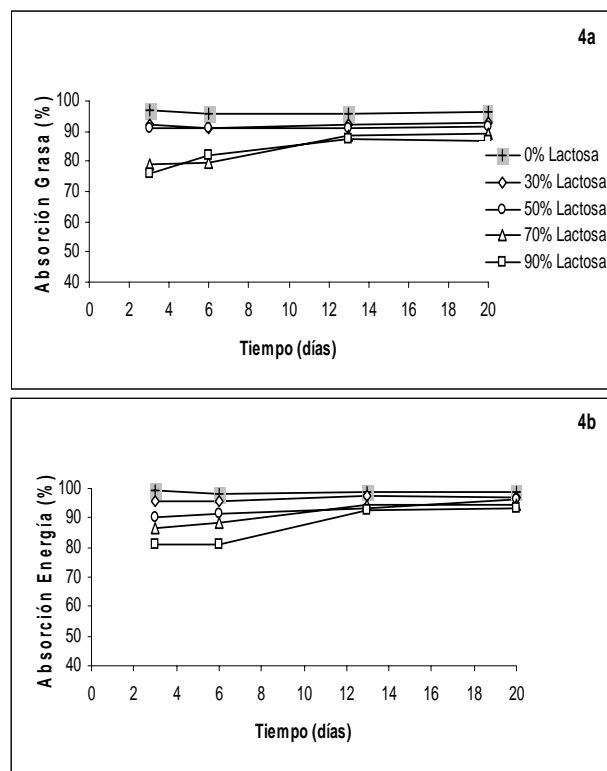
La Figura 3b es similar a la figura 3a, pero muestra la absorción aparente de los carbohidratos dietarios. En este caso, se aprecia que las ratas asignadas a las dietas con lactosa absorbieron menos carbohidratos que las ratas asignadas a la dieta sin lactosa y que esta reducción se incrementó a medida que aumentaba el nivel de reemplazo del almidón por lactosa. La figura también muestra que en contraste con lo que ocurrió con la absorción de la proteína, la absorción de los carbohidratos no mejoró con el tiempo de exposición a las dietas con lactosa. Esto lo demostró el análisis estadístico que detectó un efecto significativo sólo para la lactosa.

La Figura 4a muestra el efecto de incluir concentraciones crecientes de lactosa en la dieta sobre la absorción aparente de la grasa dietaria. Se observa que el reemplazo de almidón por lactosa redujo la absorción de la grasa en todas las ratas estudiadas. Sin embargo, en las ratas asignadas a las dietas con 30% y 50% de reemplazo las reducciones en la absorción de la grasa fueron significativamente menores y se mantuvieron constantes durante todo el experimento. En contraste, en las ratas que consumieron las dietas con 70% y 90% estas reducciones fueron significativamente mayores durante la primera semana del experimento, luego disminuyeron y se estabilizaron sin alcanzar los niveles de absorción observados en las ratas con niveles de reemplazo menores. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la lactosa y del tiempo. Esto indica que la inclusión de lactosa a la dieta redujo la absorción de la grasa mientras que con el progreso del tiempo esta absorción mejoró sólo en los grupos con mayor nivel de reemplazo. En este caso no hubo una interacción significativa, indicando que la mejora en la absorción de la grasa asociada con el tiempo ocurre hasta el día 13 pero no se pueden pronosticar mejoras mayores si se prolonga el experimento ya que las curvas de absorción se hacen paralelas a partir de ese día.

En la a Figura 4b se observan las variaciones en la absorción de la energía presente en la dieta en respuesta a la lactosa y al tiempo experimental. La figura muestra que la inclusión de lactosa en la dieta produjo una reducción, dosis dependiente, en la absorción aparente de la energía que alcanza sus valores máximos durante la primera semana del experimento y que luego se atenúa durante la segunda semana. Además, la figura sugiere que esta reducción podría anularse completamente si el experimento se prolonga. En este caso, el análisis de varianza detectó efectos significativos para la lactosa y el tiempo así como una interacción significativa entre estas variables.

FIGURA 4

Absorción aparente de la grasa y de la energía dietarias en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón por lactosa



Las Figuras 4a y 4b muestran las variaciones en la absorción aparente de la grasa y de la energía dietarias respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo en el caso de la grasa mientras que en el caso de la energía mostró además una interacción lactosa tiempo significativa. La comparación de medias indicó que las absorciones de grasa y energía de las ratas que consumieron lactosa fueron menores que las que no la consumieron durante el período estudiado. Para detalles experimentales ver las notas al pie de las Figuras 1 y 2.

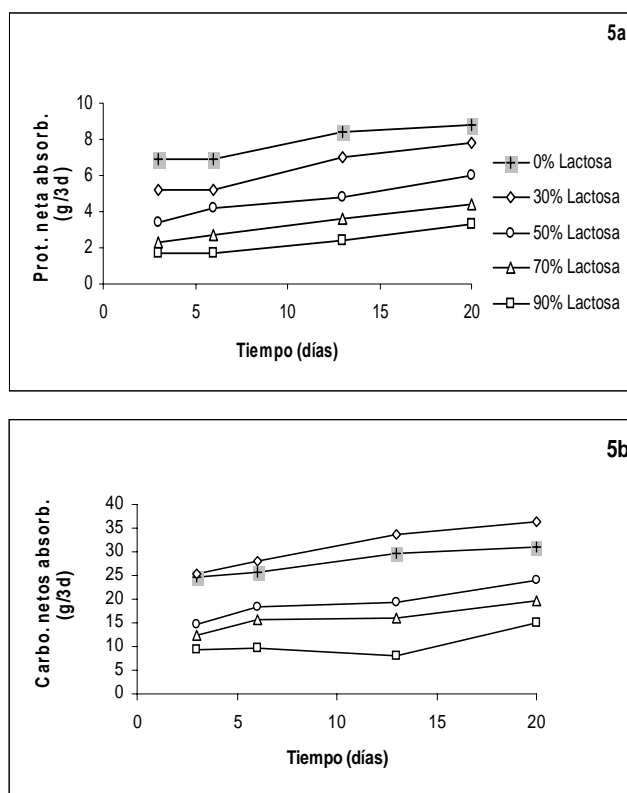
Debido a que las mayores reducciones en la absorción aparente de los macronutrientes coincidieron con los períodos en que la diarrea era más severa, se realizó un estudio de correlación y regresión entre la masa fecal excretada y los resultados de absorción aparente descritos. Este análisis mostró coeficientes de correlación altos y negativos entre estas variables (Coeficientes de correlación entre la absorción aparente de proteína, carbohidratos, grasa y energía vs masa fecal seca fueron -0.98; -0.85; -0.87 y -0.99 respectivamente), indicando que a mayor severidad de la diarrea (mayor masa fecal), menor fue la absorción aparente de los nutrientes consumidos.

**Absorción neta**

Los resultados de absorción neta de los macronutrientes y de energía se muestran en las Figuras 5 y 6 e indican que las cantidades netas absorbidas para todos estos componentes dietarios disminuyen a medida que aumenta el nivel de reemplazo del almidón por lactosa pero aumenta gradualmente con el tiempo experimental. Esto ocurre porque con el progreso del experimento e independientemente del nivel de reemplazo, las ratas consumieron más alimento, (Figura 1) sus diarreas fueron menos severas (Figura 2) y su eficiencia absorptiva aumentó (Figuras 3 y 4).

FIGURA 5

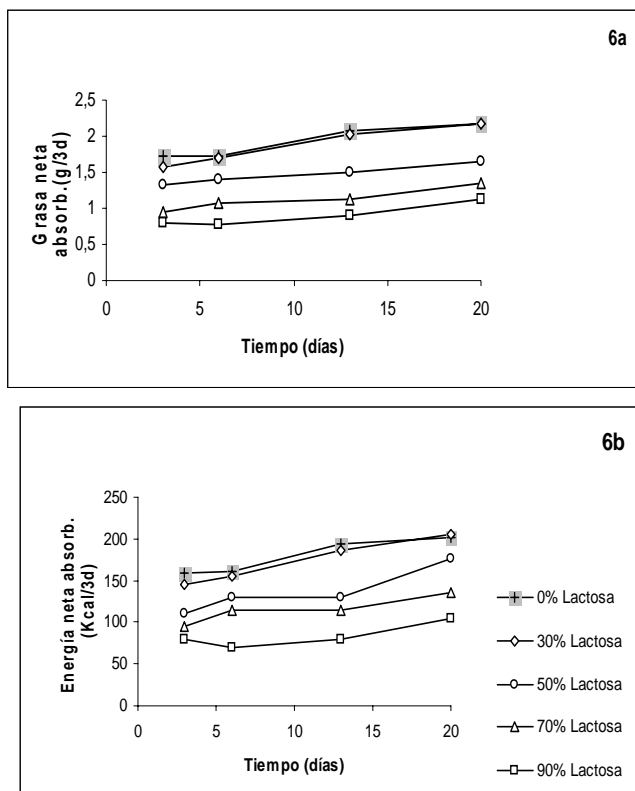
Proteína y carbohidratos netos absorbidos en cada período de recolección fecal en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón por lactosa



Las Figuras 5a y 5b muestran las variaciones en la proteína y los carbohidratos netos absorbidos respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo tanto en el caso de la proteína como de los carbohidratos. La comparación de medias indicó que las absorciones netas de la proteína dietaria de las ratas que consumieron lactosa fueron menores que las que no la consumieron mientras que en el caso de los carbohidratos ocurrió lo mismo pero la absorción neta de las ratas que consumieron la dieta con 30% de reemplazo fue igual o mayor a la medida en las ratas que no consumieron lactosa. Para mayores detalles ver Figuras 1 y 2.

FIGURA 6

Grasa y energía netas absorbidas en cada período de recolección fecal en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes de almidón por lactosa



Las Figuras 6a y 6b muestran las variaciones en la grasa y la energía netas absorbidas respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo tanto en el caso de la grasa como de la energía. La comparación de medias indicó que con excepción del grupo que consumió el 30% de reemplazo, las absorciones netas de la grasa y energía dietaria de las ratas que consumieron lactosa fueron menores que las que no la consumieron. Para mayores detalles ver las Figuras 1 y 2.

En las Figuras 5 y 6, también se observa que las cantidades de carbohidratos, grasa y energía absorbidos por las ratas asignadas al grupo con el menor nivel de reemplazo (30%) fue muy similar y en ocasiones mayor a las absorbidas por las ratas que no consumieron lactosa. Sin embargo, cuando los niveles de reemplazo fueron mayores, las absorciones fueron progresivamente menores. El análisis estadístico mostró efectos significativos para el tiempo y la lactosa y la comparación de medias indicó que la proteína neta absorbida por todas las ratas que consumieron lactosa fue menor a la absorbida por las ratas que no la consumieron mientras que en el caso de los carbohidratos, grasa y energía esto se cumplió sólo en las ratas que consumieron las dietas con reemplazos mayores al 30%.

Como la cantidad de macronutrientes absorbidos es un factor determinante en el aumento de peso logrado durante el crecimiento, se calcularon los coeficientes de correlación entre la absorción neta de proteína, carbohidratos, grasa y energía sobre el peso corporal de las ratas estudiadas. Los resultados mostraron coeficientes de correlación altos y positivos (Coeficientes de correlación entre la absorción neta de proteína, carbohidratos, grasa y energía vs peso corporal fueron 0.81; 0.80; 0.82 y 0.86 respectivamente) indicando que, durante el proceso diarreico, las ratas que más absorbieron fueron las que más crecieron.

## DISCUSION

Mientras las condiciones sanitarias de los países en desarrollo no sean adecuadamente atendidas, no se puede esperar que la incidencia de diarrea disminuya y en consecuencia, el esfuerzo debe concentrarse en su tratamiento. Además de la rehidratación, que representa la primera línea de acción, otro aspecto crucial del tratamiento es una adecuada alimentación durante el episodio diarreico así como durante la fase de recuperación (19). Por esta razón, el estudio de los alimentos más apropiados para el tratamiento nutricional de la diarrea es especialmente importante en estos países.

Los resultados de este estudio indican que la concentración de lactosa en la dieta determina la severidad de la diarrea obtenida así como sus consecuencias nutricionales. Esto lo demuestra muy claramente la observación de que a niveles de reemplazo de almidón por lactosa del 30%, prácticamente no hubo diarrea, no se afectó el consumo ni la absorción de los macronutrientes dietarios y en consecuencia, se mantuvo un crecimiento similar al observado en las ratas controles. En contraste, niveles mayores de reemplazo produjeron diarreas y reducciones en la absorción y el crecimiento que fueron proporcionales a la concentración de lactosa en la dieta. Asimismo, se observó que la concentración de lactosa en la dieta, fue más importante que la cantidad total de lactosa consumida. Esto encuentra apoyo en la observación de que los grupos con los niveles más altos de reemplazo (70% y 90%) mostraron consumos similares de lactosa, pero la severidad de la diarrea, así como sus consecuencias, fueron más notables en el grupo de ratas que consumieron la dieta con 90% de reemplazo del almidón por lactosa.

Los efectos de diarreas de diferente severidad sobre el consumo y disponibilidad de los nutrientes dietarios observados en este experimento, muestran claramente que tanto la severidad de la diarrea como su duración son factores determinantes en la disminución de crecimiento que produce. Así, a los más altos niveles de reemplazo en que tanto la severidad de la diarrea como su duración fueron mayores, se observaron las reducciones de crecimiento más notables, indicando un mayor grado de desnutrición. Es probable que

la mortalidad observada en estos grupos (70% y 90% de reemplazo) haya estado asociada al menos parcialmente a la desnutrición que causaron.

Un problema nutricional que se presenta durante el episodio diarreico es el déficit tanto en el consumo como en la disponibilidad energética (9). Esto es importante ya que en condiciones en las que el aporte energético es insuficiente, la proteína dietaria no se retiene adecuadamente (20) y sus aminoácidos se oxidan para producir energía, con lo que aumenta la producción de compuestos nitrogenados en la orina (10) y en consecuencia la carga renal. Por esta razón, durante el episodio diarreico es importante mantener un adecuado consumo y disponibilidad de los componentes energéticos de la fórmula (carbohidratos y grasa) y al mismo tiempo mantener la proteína estrictamente dentro de los requerimientos del niño y de la mejor calidad posible para favorecer su incorporación en los tejidos, reduciendo así su conversión a energía.

De acuerdo con lo anterior, en este estudio se determinó la importancia relativa tanto de la disminución del consumo de alimento como de la disminución de la digestibilidad de la energía sobre la energía a la que realmente tuvieron acceso estas ratas y que se describió como energía neta en la figura 6. Concentrándose en las ratas con las diarreas más severas, que fueron las asignadas a los grupos que consumieron las dietas con 70% y 90% de reemplazo, durante la primera recolección fecal, se observa en la figura 1 que consumieron aproximadamente 10g menos que las controles, lo que indica que consumieron unas 40 Kcal menos. Como de la figura 6 se desprende que el déficit en la energía neta a la que tuvieron acceso estas ratas con respecto a las controles fue de aproximadamente 80 Kcal, se puede concluir que del déficit total en la energía neta, aproximadamente la mitad se explica por una reducción en el consumo y la otra mitad fue atribuible a la reducción en la digestibilidad energética. En otras palabras, cuando la diarrea es severa, las ratas experimentan un déficit energético que se produce tanto por una disminución del consumo de alimento como por una disminución en la digestibilidad energética del alimento consumido, y estos dos componentes del déficit, fueron igualmente importantes en magnitud. Esta situación cambia cuando disminuye la severidad de la diarrea ya que como muestra la Figura 4 la digestibilidad de la energía aumenta más rápido que el consumo (Figura 1) a medida que la severidad de la diarrea disminuye. En consecuencia, la importancia de la digestibilidad en el déficit energético se hace cada vez menor.

Comparando los resultados del análisis anterior con los obtenidos en estudios realizados en niños con diarrea aguda (9), se observa que en los niños, durante las primeras 48 hr de hospitalización, la contribución de la disminución del consumo y de la digestibilidad en el déficit energético fue de 80% y 20% respectivamente. Sin embargo, hay que destacar que la mayor importancia del consumo detectada en los estudios con

niños probablemente esté asociada con la eliminación total de la ingesta a la que se somete a los niños durante las primeras horas de hospitalización con el fin de estabilizar su condición hídrica. Como en el presente estudio no se restringió el consumo, se pudo ver con más claridad la importancia relativa del consumo de alimento y la digestibilidad energética en el déficit energético que acompaña a la diarrea sugiriendo que son igualmente importantes. Lo anterior, que por razones éticas no sería posible determinarlo en niños, si se pudo evaluar en este modelo animal e indica, que para minimizar los riesgos de desnutrición durante el episodio diarreico, es tan importante mantener un consumo de adecuado como seleccionar alimentos que aporten nutrientes ricos en energía digestible.

Algo que vale la pena resaltar es que el modelo de diarrea que se propone aquí, es no infeccioso. Sin embargo, como su objetivo es exclusivamente nutricional, esto no es una limitación importante. Esta afirmación se basa en observaciones realizadas en niños con diarrea aguda provocadas por rotavirus así como por otros agentes etiológicos no identificados (21). En ese estudio se observó que las pérdidas de macronutrientes fecales, así como la reducción en la ingesta de fórmula fue igual en ambos grupos indicando que los efectos del agente etiológico no alteran los efectos nutricionales producidos por la diarrea.

Una diferencia entre una diarrea infecciosa y una no infecciosa como la producida en este estudio, es que, en las diarreas infecciosas pueden aumentar los requerimientos energéticos debido a un aumento en la velocidad metabólica asociado al estado febril, que caracteriza a este tipo de diarrea. Esto aumentaría aun más el déficit energético y el riesgo de desnutrición. Sin embargo, ese aumento o factor de stress en el caso de fiebres tratables y moderadas como las que se producen en niños con diarrea, no son tan importante en magnitud (22).

Una característica de la diarrea producida con lactosa y que coincide con la diarrea infantil, es que disminuye con el tiempo tal como se muestra en la Figura 2. Debido a que esta disminución en la severidad de la diarrea ocurre a pesar de que la concentración de la lactosa dietaria no varía, señala que con el tiempo, las ratas se adaptan al consumo de este carbohidrato. En este experimento, la adaptación se observó con todas las concentraciones de lactosa estudiadas, indicando que la concentración de lactosa en la dieta no es una limitación con respecto a este proceso adaptativo.

En conclusión, este estudio muestra que el reemplazo del almidón por lactosa en la dieta de ratas en crecimiento, produce una diarrea no infecciosa, cuya severidad depende del nivel de reemplazo y que reproduce los efectos negativos de la diarrea sobre el estado nutricional. Los resultados muestran que a los más altos niveles de reemplazo se logran reducciones en la digestibilidad de los macronutrientes similares a los medidos en niños hospitalizados con diarrea aguda.

Adicionalmente, muestran que la diarrea se instala muy rápidamente y que las diarreas más severas y las digestibilidades más bajas, se obtienen durante la primera semana de exposición a las dietas con lactosa. Estas observaciones señalan que este es el período ideal para evaluar la digestibilidad de los alimentos durante la diarrea. En contraste, las reducciones de consumo y crecimiento asociadas con el proceso diarreico permanecen por un lapso de tiempo mayor, a pesar que la severidad de la diarrea sea menor, por esta razón, para la estimación de los efectos de la diarrea sobre el crecimiento y la composición corporal el estudio puede prolongarse unas semanas adicionales. También es importante señalar que si se utilizan niveles de reemplazo mayores al 50% puede haber una mortalidad moderada que en este experimento llegó a niveles del 25% y que debe considerarse al momento de planificar estudios orientados a aportar información sobre el tema de la alimentación durante el proceso diarreico o su recuperación. Es posible que en la búsqueda de los alimentos más apropiados para el tratamiento nutricional de la diarrea, la combinación de estudios con animales y humanos, resulte tan exitosa como lo fue en el caso del desarrollo de las soluciones de rehidratación oral (4).

### REFERENCIAS

- Duggan C, Fontaine O, Pierce NF, Glass RI, Mahalanabis D, Alam NH, et al. Scientific rationale for a change in the composition of oral rehydration solution. *J Amer Med Assoc* 2004; 291: 2628-2631.
- Keusch GT, Fontaine O, Bhargava A, Boschi-Pinto C, Bhutta ZA, Gotuzzo E. et al. Diarrheal diseases. In : Jamison DT, Brennan JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB et al. Editors. Disease control priorities in developing countries. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2006. p.371-388.
- Guerrant RL, Oriá RB, Moore SR, Oriá MO, Lima AA. Malnutrition as an enteric infection disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev* 2008; 66: 487-505.
- Ruxin JN. Magic bullet: The history of oral rehydration therapy. *Medical History* 1994; 38:363-397.
- Hirschhorn N. Oral rehydration therapy for diarrhea in children. A Basic primer. *Nutr Rev* 1982; 40:97-104.
- Pruss-Ustun A, Corvalan C. Preventing disease through healthy environments. Toward an estimate of the environment burden of disease. Geneva: WHO Press; 2006.
- Kaler SG. Diseases of poverty with high mortality in infants and children. Malaria, mézales, lower respiratory infections and diarrheal illnesses. *Annals New York Academy of Sciences* 2008; 1136: 28-31.
- Brunser O, Espinoza J, Araya M. Estado nutricional y prácticas dietarias en la alimentación del infante como factores de riesgo en las enfermedades diarreicas. *Arch Latinoam Nutr* 1992; 42 2S: 39-41.
- Hevia P, Carías D, Cioccia AM, González E. Diarrea y nutrición. Experiencias en niños y ratas. *An Venez Nutr* 1998; 11(1) 28-36.
- Carías D, Cioccia AM, Hevia P, Romer H, Guerra M, Brito O. Utilización de nutrientes en niños con diarrea aguda alimentados con fórmulas a base de pollo y soya. *Arch Latinoam Nutr* 1999; 49: 130-137.
- Guerrant RL, Schorling JB, Mc Auliffe JF, de Souza MA. Diarrea as a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:28-35.
- Mata L. Diarrheal disease as a cause of malnutrition. *Amer J Trop Med Hyg* 1992; 47: 16-27.
- Gracey M. Diarrhea and malnutrition: A challenge for pediatricians. *Journal of Pediatric Gastroenterol and Nutr* 1996; 22: 6-16.
- Pelletier DL, Frongillo EA, Schroeder DG, Habicht JP. The effect of malnutrition on child mortality in developing countries. *Bulletin World Health Organ* 1995; 73: 443-448.
- American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition Ad-Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1997; 107: 1340-1348.
- Liuzzi JP, Cioccia A, Hevia P. In well-fed young rats, lactose-induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamins A and E and affects preferentially vitamin E status. *J Nutr* 1998; 128:2467-2472.
- Hevia P, Cioccia A. Application of a colorimetric method to the determination of nitrogen in nutritional studies with rats and humans. *Nutr Rep Int* 1988; 38:1129-1136.
- Blight EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
- Centres for Disease Control and Human Services (CDC). Directrices para el tratamiento de la diarrea aguda. 2008. USA Gov. Department of Health and Human Services.
- Pereira, M., Cioccia, A.M., Brito, O. y Hevia, P. (1990). Protein quality evaluation at reduced food intakes. *Italian Journal of Food Science. Special Issue* 264-267. (Proceedings of the Third International Conference on Leaf Protein Research).
- Romer H, Paéz M, Hevia P, Piña JM, Urrestarazu MI, Pérez Schael I. Estudio comparativo de las pérdidas fecales de nitrógeno, lípidos y energía en niños deshidratados con diarrea debida a rotavirus y otros agentes. *GEN* 1989;43:23-27.
- McIntyre J, Hull D. Metabolic rate in febrile infants. *Arch Dis Child* 1996; 74: 206-209.

Recibido: 18-03-2009

Aceptado: 29-06-2009

## Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos

Mayi Agueda, María Ángeles Zulet, José Alfredo Martínez

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología, Universidad de Navarra, Pamplona, España

**RESUMEN.** El término ácido linoleico conjugado (CLA) hace referencia a un grupo de isómeros del ácido linoleico, caracterizados por tener enlaces dobles conjugados en varias posiciones y conformaciones. El CLA se encuentra de forma natural en algunos alimentos, aunque desde que se le atribuyen efectos beneficiosos sobre varios aspectos relacionados con la salud, numerosos grupos investigadores han estudiado los efectos de la suplementación con este ácido graso. En este sentido, el efecto del CLA sobre el perfil lipídico de los animales ha sido extensamente estudiado y existen evidencias confirmadas de beneficios sobre diversos marcadores metabólicos. Sin embargo, los resultados de los ensayos de intervención en humanos son ambiguos. El objetivo de esta revisión fue reunir los datos disponibles y más actuales acerca de los efectos del CLA en el perfil lipídico de humanos. Diversos estudios no hallaron efectos significativos en ninguna de las variables estudiadas; sin embargo, otros trabajos encontraron tanto efectos beneficiosos como desfavorables en el colesterol total, c-LDL, c-HDL, índice aterogénico, triglicéridos y lipoproteína(a). Esta discrepancia podría probablemente deberse a las diferencias en la dosis, composición de isómeros y placebo utilizado, así como a la duración del estudio y al estado nutricional de los sujetos incluidos, entre otros. No obstante, el análisis de los estudios de 12 semanas de duración, realizados con una mezcla en cantidades iguales de los dos isómeros principales del CLA (cis-9, trans-11 y trans-10, cis-12) y con dosis diarias de entre 3 y 4 g aproximadamente, parecen ofrecer los resultados más beneficiosos.

**Palabras clave:** Acido linoleico conjugado, metabolismo lipídico, colesterol, triglicéridos, lipoproteína(a).

### INTRODUCCION

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un término colectivo que hace referencia a un grupo de isómeros del ácido linoleico (LA), caracterizados por presentar enlaces dobles conjugados en varias posiciones y conformaciones (1,2). Los dos isómeros con actividad biológica conocida son *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12. En este contexto, el CLA constituye una pequeña parte de la fracción lipídica de la carne y de los productos lácteos de animales rumiantes. El contenido en CLA de estos alimentos es variable, pudiendo ser modificado por varios factores, como la dieta, la edad o la raza del animal y factores estacionales. El CLA también puede producirse de forma artificial mediante procesos de hidrogenación parcial

**SUMMARY. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on human lipid profile.** The term conjugated linoleic acid (CLA) concerns a group of isomers of linoleic acid, which are characterized by having conjugated double bonds in several positions and conformations. CLA is found naturally in some foods, but since CLA was first held to cause beneficial effects on various health-related issues, many investigations have been conducted to elucidate the effects of dietary supplementation with CLA. The effects of CLA on lipid profiles on animals have been extensively studied, and there is sound evidence of its benefits in blood metabolic markers. However, clinical trials in humans have provided ambiguous results. The aim of this review was to gather up-to-date available data about the effects of CLA on human lipid profile. Although most studies did not show any significant effect in none of the studied variables, some trials reported both beneficial and detrimental effects on total cholesterol, LDL-c, HDL-c, atherogenic index, triglycerides and lipoprotein(a). This discrepancy could be due to differences in dosage, isomer composition, duration of the study, placebo and participating subjects, among others. However, studies with a duration of two weeks, carried out using a mix of equal amounts of the two main CLA isomers (9-*cis*, 11-*trans* and 10-*trans*, 12-*cis*) and with doses of 3 to 4 grams per day, seem to offer the most beneficial results.

**Key words:** Conjugated linoleic acid, lipid metabolism, cholesterol, triglycerides, lipoprotein(a).

del ácido linoleico, así como calentando este ácido graso en presencia de sustancias alcalinas (3,4). Desde su descubrimiento, las investigaciones sobre los efectos del CLA han sido dirigidas principalmente a la búsqueda de sus potenciales capacidades anticarcinogénicas y reductoras de grasa corporal, siendo numerosos los trabajos llevados a cabo tanto en animales como en humanos en los últimos años (4,5). Sin embargo, existen relativamente pocos datos acerca del papel que ejerce el CLA en la regulación de los lípidos plasmáticos (4,6) siendo a menudo contradictorios los resultados obtenidos acerca del efecto del CLA sobre los niveles de colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), triglicéridos (TAG) y lipoproteína(a) (Lp(a)). La

presente revisión incluye los principales ensayos de intervención nutricional pertenecientes a este campo y realizados entre los años 2000 y 2009 (Tabla 1), que incluyen como palabras clave “CLA”, “humanos” y “perfil lipídico” o “colesterol” en la base Pubmed. Además, se llevó a cabo una revisión de las variables relacionadas con el metabolismo lipídico en aquellos estudios llevados a cabo con CLA, cuyo objetivo principal fue el análisis de su efecto sobre la composición corporal. Según estas premisas y criterios, 25 artículos originales han sido incluidos en esta revisión (2,7-30).

### Efecto del CLA sobre el perfil lipídico

#### Efectos sobre el colesterol total y c-LDL

El efecto que ejerce el CLA sobre la concentración plasmática de colesterol total va acompañado por el mismo efecto en los niveles de c-LDL en la mayoría de los casos. De los seis estudios que observaron efectos significativos sobre los niveles de colesterol total y/o c-LDL, la mayoría encontró efectos deseables, viéndose un efecto reductor del CLA sobre estas variables (7,19,21). Sin embargo, en uno de los estudios se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de colesterol total y c-LDL (11). Además, en un estudio fue el colesterol la única variable que se vio alterada (22), mientras que en otro, fue el aumento de las concentraciones de c-LDL el único cambio encontrado (21). En este último caso, y a diferencia del resto de los estudios, los isómeros del CLA fueron administrados en forma de ácidos grasos libres (AGL), en lugar de suplementarlos como TAG.

Uno de los estudios que halló efectos favorecedores tras la ingesta de CLA sobre el colesterol total y el c-LDL fue el llevado a cabo por Blankson y colaboradores (7). Estos autores realizaron un estudio unicéntrico, aleatorizado y doble ciego, controlado por placebo. Cinco grupos paralelos con 60 sujetos sanos de ambos sexos (12 x 5), y con un IMC comprendido entre 25 y 35 kg/m<sup>2</sup> fueron incluidos en el estudio de 12 semanas de duración. El grupo placebo ingirió 9 g de aceite de oliva diariamente, y los 4 grupos restantes fueron suplementados con 1,7; 3,4; 5,1 y 6,8 g de CLA, respectivamente. En cuanto a los isómeros administrados, la preparación de CLA consistió en una mezcla de iguales cantidades de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12. Además, a los sujetos se les ofreció el seguimiento de un programa de entrenamiento, que fue registrado como ligero o intenso. De los 60 participantes que fueron reclutados y 47 terminaron el estudio completo. Los análisis clínicos de laboratorio mostraron reducciones en el colesterol total y c-LDL en todos los grupos de CLA, aunque sólo fueron estadísticamente significativas en los dos grupos que fueron suplementados con dosis inferiores de CLA (1,7 y 3,4 g/día).

Tricon y colaboradores (19) encontraron resultados similares en su trabajo de intervención nutricional, aunque en este

caso, los autores tuvieron por objetivo comparar los efectos de los distintos isómeros. Para ello, 49 hombres sanos, con un IMC comprendido entre 18 y 34 kg/m<sup>2</sup>, participaron en un estudio aleatorizado, doble-ciego y cruzado de aproximadamente 13 meses de duración. Los sujetos fueron asignados a uno de dos grupos y consumieron cápsulas que contenían el isómero *trans*-10, *cis*-12 de CLA o *cis*-9, *trans*-11 de CLA por 3 periodos consecutivos de 8 semanas con un aumento de la dosis, antes de pasar al consumo del otro isómero. Los sujetos, por lo tanto, ingirieron cada isómero por 6 meses, separados por un periodo de lavado de 6 semanas de duración. Las cápsulas enriquecidas en *cis*-9, *trans*-11 CLA contenían 79,3% del isómero *cis*-9, *trans*-11 y 7,8% de *trans*-10, *cis*-12, mientras que las cápsulas enriquecidas en *trans*-10, *cis*-12 CLA contenían 84,1% de *trans*-10, *cis*-12 y 10,6% de *cis*-9, *trans*-11. Los sujetos ingirieron 1 (0,59 g/día), 2 (1,19 g/día) o 4 (2,38 g/día) cápsulas incluyendo el isómero *cis*-9, *trans*-11 de CLA, y 1 (0,63 g/día), 2 (1,26 g/día) o 4 (2,52 g/día) de cápsulas incluyendo el isómero *trans*-10, *cis*-12 de CLA. El tamaño de la muestra para cada momento oscila entre 39 y 49 sujetos. Los resultados del análisis bioquímico mostraron un efecto opuesto de ambos isómeros de CLA. Así, la ingesta de altas dosis del isómero *cis*-9, *trans*-11 redujo significativamente los niveles de colesterol total y c-LDL, comparado con el grupo control. No obstante, el isómero *trans*-10, *cis*-12 aumentó los niveles de colesterol total y c-LDL en dosis bajas, aunque mantuvo los niveles iniciales en dosis altas, sin obtener en ninguno de los casos diferencias significativas.

Sin embargo, otros autores encontraron que el CLA podría aumentar los niveles séricos de ambas variables. En efecto, Smedman y colaboradores (11) estudiaron a 53 sujetos sanos, (27 hombres y 26 mujeres) en un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo. Dos semanas antes de comenzar la intervención, a todos los sujetos se les facilitaron cápsulas control con aceite de oliva. Durante las 12 semanas de estudio cada individuo fue asignado al grupo control o al grupo tratado con CLA. Los sujetos de éste último grupo ingirieron 4,2 g diarios de CLA, en iguales cantidades de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12, mientras que a los sujetos del grupo control se les continuó administrando el placebo y se solicitó a los sujetos que no cambiaran sus hábitos de dieta o actividad física. Todos los participantes completaron el estudio, pero debido a una falta de adherencia, solamente 50 sujetos fueron incluidos en los principales análisis estadísticos (24 y 26 sujetos del grupo control y del grupo CLA, respectivamente). El análisis bioquímico no mostró diferencias significativas entre los grupos en los niveles séricos de colesterol total y c-LDL. Sin embargo, se observó un aumento de estas variables dentro del grupo suplementado con CLA al final del estudio, comparado con los valores iniciales.

### Efectos sobre el c-HDL

De forma similar a las variables anteriores, son relativamente escasos los estudios que encuentran alteraciones significativas en los niveles plasmáticos de c-HDL. No obstante, es de destacar que en prácticamente todos ellos el CLA ejerce un papel reductor de esta variable (7,9,10,13,16,18,21,26,30). De hecho, el trabajo realizado por Moloney y colaboradores (20) fue el único que mostró un aumento significativo en los niveles séricos del colesterol c-HDL tras la ingesta de CLA.

Por otra parte, Riséus y colaboradores (13) llevaron a cabo un estudio de intervención con CLA aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo de 12 semanas de duración. En esta investigación, se reclutaron hombres con IMC comprendido entre 27 y 39 kg/m<sup>2</sup> y con síndrome metabólico (obesidad abdominal, dislipemias, hipertensión y resistencia a la insulina), de los que 60 participantes fueron incluidos en el estudio y asignados a uno de tres grupos para que recibieran 3,4 g/día de: (1) una mezcla de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 (35,4%) y *trans*-10, *cis*-12 (35,9%) de CLA, (2) el isómero *trans*-10, *cis*-12 purificado (76,5% *trans*-10, *cis*-12 y 2,9% *cis*-9, *trans*-11) de CLA o (3) aceite de oliva como placebo. A todos los sujetos se les facilitó su dosis diaria en forma de 6 cápsulas, que tomaron con el desayuno y la cena, y se les solicitó que mantuvieran sus hábitos de alimentación o ejercicio físico durante el estudio. De los 60 participantes iniciales, 57 voluntarios fueron incluidos para el análisis estadístico final. El análisis bioquímico mostró que la suplementación con ambas preparaciones de CLA (mezcla en cantidades iguales de los dos isómeros o *trans*-10, *cis*-12 purificada) reduce los niveles de c-HDL de forma significativa comparado con el grupo placebo.

Dos años después, Whigham y colaboradores (18) realizaron un estudio de intervención nutricional, en el que 50 individuos sanos (15 hombres y 35 mujeres), con un IMC de entre 27 y 35 kg/m<sup>2</sup> participaron dentro de un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo de 52 semanas de duración. Los sujetos fueron aleatoriamente asignados en dos grupos para que recibieran diariamente seis cápsulas con un aporte de 6 g de CLA (mezcla de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 en iguales cantidades) o de placebo (aceite de girasol alto oleico). El estudio de intervención se realizó en tres fases. La fase I consistió en una dieta baja en calorías (LCD) que facilitara una rápida pérdida de peso. Para ello, se suministró una dieta primordialmente líquida que aportaba 13 kcal/kg de peso corporal deseable (el criterio fue el peso de los voluntarios en IMC de 22 kg/m<sup>2</sup>). La fase I terminó cuando los sujetos obtuvieron una pérdida de peso de entre 10% y 20%, o en la semana 12. Todos los participantes completaron la primera fase. La fase II consistió en una fase de mantenimiento de peso de 16 semanas de duración. Durante este tiempo, inicialmente los sujetos fueron reintroducidos gradualmente a la alimentación sólida durante 2 semanas de periodo de

transición. Después ingirieron una dieta de mantenimiento diseñada para preservar o extender la pérdida de peso, que consistía en 25-30 kcal/kg de peso en IMC de 22 kg/m<sup>2</sup>. Esta fase fue superada por 48 sujetos. La fase III consistió en una fase de 24 semanas de duración en la que todos los sujetos recibieron 6 g/día de CLA o de placebo. Los voluntarios fueron instruidos para que mantuvieran la dieta de mantenimiento de peso. En esta ocasión, 46 sujetos completaron la fase. Los resultados mostraron una diferencia significativa en los niveles plasmáticos de c-HDL entre los dos grupos al final de la etapa III, siendo significativamente superior en el grupo control. Es relevante indicar que los niveles de c-HDL aumentaron dentro del grupo CLA a lo largo de las 52 semanas, pero el aumento no fue tan pronunciado y no alcanzó la significación, tal y como ocurrió dentro del grupo control.

### Efectos sobre el índice aterogénico

El índice aterogénico muestra la relación entre el colesterol total y el c-HDL. De los 25 artículos analizados, solamente en seis se calculó esta variable que se encuentra estrechamente relacionada con el riesgo cardiovascular (9,14,19,22,23,30). De estos estudios, solamente dos encontraron cambios significativos tras la ingesta de CLA, siendo este efecto en ambos casos desfavorable a (22,30). Por otro lado, en cuatro trabajos de investigación se estudió la relación entre los niveles séricos de c-LDL y c-HDL. En este caso, los resultados obtenidos fueron muy dispares, pues dos ensayos encontraron un aumento significativo de este índice (22,23), mientras que en los otros dos el consumo de CLA produjo una reducción en la variable (19,20).

Uno de los estudios que no encontró efectos significativos del CLA en el índice aterogénico fue el llevado a cabo por Tricon y colaboradores (23). Los autores incluyeron a 32 hombres sanos en un ensayo aleatorizado, doble-cego, controlado por placebo y cruzado, de 20 semanas de duración total. El objetivo del trabajo de investigación fue comparar los efectos de productos lácteos ricos en CLA obtenidos a partir del enriquecimiento de la dieta de las vacas con aceite de pescado y de girasol en cantidades iguales, con productos lácteos pobres en CLA. El ensayo comenzó con una fase inicial de habituación en el que los individuos ingirieron productos lácteos comerciales diariamente: 500 mL de leche entera UHT, 12,5 g de mantequilla y 28 g de queso. Esta fase fue diseñada para permitir a los participantes acostumbrarse al consumo de las cantidades objetivo requeridos de productos lácteos. Al finalizar este periodo, los voluntarios fueron aleatoriamente asignados a uno de los grupos de intervención. Durante las siguientes 6 semanas de estudio (periodo de intervención), los sujetos consumieron diariamente productos lácteos enriquecidos en CLA (500 mL de leche entera UHT, 12,5 g de mantequilla y 36,3 de queso) que contenían 1,421 g del isómero *cis*-9, *trans*-11, o productos lácteos

TABLA 1  
Principales investigaciones sobre el efecto del ácido linoleico (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos

Autor, Año	Duración	Dosis de CLA (g/día)	Placebo (control)	CT	c-LDL	c-HDL	Ratio CT:c-HDL	TAG
Blankson, 2000 (7)	12 semanas	1,7	Aceite de oliva	↓	↓	↓	-	NS
		3,4	Aceite de oliva	↓	↓	↓	-	NS
		5,1	Aceite de oliva	NS	NS	↓	-	NS
		6,8	Aceite de oliva	NS	NS	↓	-	NS
Benito, 2001 (8)	63 días	3,9	Aceite de girasol	NS	NS	NS	-	↓
Mougios, 2001 (9)	8 semanas	0,7 o 1,4	Aceite de soja	NS	-	↓	NS	NS
Risérus, 2001 (10)	4 semanas	4,2	Aceite de oliva	NS	NS	↓	-	NS
Smedman, 2001 (11)	12 semanas	4,2	Aceite de oliva	↑	↑	NS	-	NS
Noone, 2002 (12)	8 semanas	3	Ácido linoleico	NS	NS	NS	-	↓
		3	Ácido linoleico	NS	NS	NS	-	NS
Risérus, 2002 (13)	12 semanas	3,4	Aceite de oliva	NS	NS	↓	-	NS
		3,4	Aceite de oliva	NS	NS	↓	-	NS
Petridou, 2003 (14)	90 días	2,1	Aceite de soja	NS	-	NS	NS	NS
Kamphuis, 2003 (15)	13 semanas	1,8	Ácido oleico	-	-	-	-	NS
		3,6	Ácido oleico	-	-	-	-	NS
Gauillier, 2004 (16)	12 meses	4,5 (AGL)	Aceite de oliva	NS	↑	NS	-	NS
		4,5 (TAG)	Aceite de oliva	NS	NS	↓	-	NS
Risérus, 2004 (17)	3 meses	3	Aceite de oliva	NS	NS	NS	-	NS
Whigham, 2004 (18)	52 semanas	6	Aceite de girasol (alto oleico)	NS	NS	↓	-	↑

TABLA 1 (Continuación)  
Principales investigaciones sobre el efecto del ácido linoleico (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos

Autor, Año	Duración	Dosis de CLA (g/día)	Placebo (control)	CT	c-LDL	c-HDL	Ratio CT: c-HDL	TAG
Tricon, 2004 (19)	13 meses	0,59-2,38	No aplicable	↓	↓	NS	NS ↓ c-LDL: c-HDL	NS
		0,63-2,52	No aplicable	NS	NS	NS	NS	↑
Moloney, 2004 (20)	8 semanas	3	Aceite de palma y soja	NS	NS	↑	- ↓ c-LDL: c-HDL	NS
Gaullier, 2005 (21)	12 meses	3,4	No aplicable	NS	↓	↓	-	NS
Desroches, 2005 (22)	8 semanas	2,59	Mantequilla (0,24 g de CLA)	↑	NS	NS	↑ ↑ c-LDL: c-HDL	NS
Tricon, 2006 (23)	12 semanas	1,421	Leche UHT, mantequilla y queso (0,151 g de CLA)	NS	NS	NS	NS ↑ c-LDL: c-HDL	NS
Taylor, 2006 (24)	12 semanas	4,5	Aceite de oliva	NS	NS	NS	-	NS
Steck, 2007 (25)	12 semanas	3,2	Aceite de cártamo	NS	NS	NS	-	NS
		6,4	Aceite de cártamo	NS	NS	NS	-	NS
Gaullier, 2007 (26)	6 meses	4,5	Aceite de oliva	NS	NS	↓	-	NS
Nazare, 2007 (27)	14 semanas	3,76	Yogur	NS	-	NS	-	NS
Watras, 2007 (28)	6 meses	4	Aceite de cártamo	NS	NS	NS	-	NS
Laso, 2007 (29)	12 semanas	3	Leche de vaca desnatada	NS	NS	NS	-	NS
Tholstrup, 2008 (30)	16 semanas	4,6	Aceite de oliva	NS	NS	↓	↑	↑
		5,1	Aceite de oliva	NS	NS	NS	NS	NS
Raff, 2008 (2)	5 semanas	5,1	Mantequilla	NS	NS	NS	NS	NS

CLA: ácido linoleico conjugado H: hombre M: mujer IMC: índice de masa corporal c-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad c-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad TAG: triacilglicéridos Lp(a): Lipoproteína(a) c9,t11: *cis*-9, *trans*-11 t10,c12: *trans*-10, *cis*-12 ↑: aumento ↓: disminución NS: no significativo AGL: ácidos grasos libres

control (500 mL de leche entera UHT, 12,5 g de mantequilla y 18 g de queso) que contenían 0,251 g del isómero *cis*-9, *trans*-11 de CLA. Después, y tras una interrupción de 8 semanas (7 semanas de periodo de lavado más 1 semana de periodo de habituación), los sujetos comenzaron con el otro tratamiento nutricional, que duró otras 6 semanas. Durante la fase control, los participantes ingirieron 35,4 g de grasas de los productos experimentales diariamente, mientras que durante la fase CLA consumieron 36,5 de grasas. Los resultados analíticos mostraron que, aunque el ratio c-LDL:c-HDL fue significativamente mayor en el grupo suplementado con productos ricos en CLA comparado con el grupo control, el ratio colesterol total:c-HDL no sufrió modificaciones atribuibles a la suplementación de CLA.

No obstante, más tarde Tholstrup y colaboradores (30) observaron cambios en el índice aterogénico en su trabajo de investigación. Los autores realizaron un estudio aleatorizado, doble-ciego, paralelo, controlado por placebo y de 16 semanas de duración en el que participaron 81 mujeres sanas postmenopáusicas, con IMC igual o inferior a 35 kg/m<sup>2</sup>. Los voluntarios fueron aleatoriamente asignados a uno de tres grupos, de forma que ingirieran diariamente suplementación de 4,6 g de mezcla de CLA (41,2% *cis*-9, *trans*-11; 39,9% *trans*-10, *cis*-12), 5,1 g del CLA de la leche (85% *cis*-9, *trans*-11 y 7,1% *trans*-10, *cis*-12) o aceite de oliva (placebo), y se pidió a las participantes que no modificaran su dieta habitual o el nivel de actividad física durante el estudio. De las 81 participantes seleccionadas, 75 mujeres completaron el estudio. Los resultados mostraron que las mujeres suplementadas con la mezcla de CLA tenían un 11% mayor ratio colesterol total:HDL que aquellas suplementadas con CLA de la leche, y un ratio 17% más alto comparado con el grupo control, siendo ambos valores estadísticamente significativos.

Por el contrario, otros estudios, como el realizado por Moloney y colaboradores (20), encontraron que el CLA podría tener efectos beneficiosos sobre el ratio c-LDL:c-HDL. Estos autores realizaron un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo y de 8 semanas de duración en el que participaron 32 sujetos con diabetes tipo 2 controlados solamente mediante dietoterapia. Los participantes fueron asignados a uno de dos grupos, de forma que recibieran 3,0 g/día de CLA (6 cápsulas con *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 en proporción 50:50) o placebo (mezcla de aceite de palma y de soja). Todos los participantes mantuvieron sus hábitos dietéticos y estilo de vida durante la intervención. El análisis bioquímico mostró un descenso significativo del ratio c-LDL:c-HDL dentro del grupo CLA.

### Efectos sobre los TAG

El CLA parece afectar de forma menos pronunciada a los niveles sanguíneos de TAG que al colesterol. En los artículos revisados solamente 5 autores encontraron diferencias signifi-

ficativas en los niveles séricos de TAG atribuibles a la suplementación de CLA. Los primeros estudios mostraron una reducción en su concentración (8,12). No obstante, estudios más recientes encontraron que el consumo de CLA aumenta los TAG plasmáticos (18,19,30).

Uno de los grupos investigadores que encontró efectos beneficiosos en los niveles sanguíneos de TAG tras la suplementación de CLA fue el formado por Benito y colaboradores (8). El trabajo realizado por los autores consistió en un estudio aleatorizado y controlado por placebo que se llevó a cabo con 17 mujeres sanas y de 93 días de duración total. Desde el día 1 y a lo largo del estudio, los sujetos consumieron una dieta equilibrada y controlada de acuerdo con la dieta de paso 2 de la Asociación Americana del Corazón (AMA) que cumplía con la ingesta recomendada de todos los nutrientes conocidos y contenía un 30% de grasas. La dieta consistió en el consumo de alimentos naturales excepto los suplementos de D-a-tocoferol (vitamina E, 100 mg administrado en cápsulas cada 5 días), que fueron incluidos en la dieta para asegurar unos niveles adecuados de antioxidantes en los voluntarios. Durante los 30 primeros días, todos los participantes recibieron dos cápsulas de placebo (aceite de girasol) con cada comida, para que los participantes se acostumbraran a tomar las cápsulas diariamente. El día 31, los sujetos fueron aleatoriamente asignados al grupo de intervención que recibió el suplemento con CLA (3,9 g administrados en seis capsulas diarias, dos en cada comida) hasta el final del estudio, o al grupo placebo que continuó con la ingesta de las cápsulas placebo hasta el día 93. Las cápsulas de CLA contenían 10 isómeros diferentes que consistían en los 4 isómeros principales *cis/trans* (11,4% de *cis*-9, *trans*-11; 10,8% de *trans*-8, *cis*-10; 15,3% de *cis*-11, *trans*-13; 14,7% *trans*-10, *cis*-12), sus isómeros correspondientes *cis/cis* (1,38% *cis*-8, *cis*-10; 1,59% *cis*-9, *cis*-11; 2,45% *cis*-10, *trans*-12; 1,32% *cis*-11, *trans*-13) y dos isómeros *trans/trans* (0,97% *trans*-11, *trans*-13 más *trans*-8, *trans*-10 y 5,02% *trans*-9, *trans*-11 más *trans*-10, *trans*-12). La adherencia a la dieta fue del 100%. Los resultados analíticos mostraron que, aunque los niveles plasmáticos de TAG descendieron en ambos grupos, probablemente debido a la ingesta de 30% de grasa en la dieta, solamente el cambio dentro del grupo CLA fue significativo.

Por el contrario, autores como Noone y colaboradores (12) encontraron que la ingesta de CLA podría estar estrechamente relacionada con un aumento en los niveles plasmáticos de TAG. Estos investigadores realizaron un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo de 8 semanas de duración, en el que 51 sujetos sanos (18 hombres y 33 mujeres) con un IMC < 25 kg/m<sup>2</sup> fueron asignados a uno de tres grupos para que recibieran 3,0 g/día (tres cápsulas de 1 g) de: (1) isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 de CLA en proporción 50:50; (2) isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 de CLA en proporción 80:20 y (3) ácido linoleico. El

análisis bioquímico mostró que la suplementación con CLA fue capaz de reducir significativamente los niveles de triglicéridos cuando se ingirió en cantidades iguales de los dos isómeros (CLA 50:50).

### Efectos sobre la Lp(a)

La Lp(a) es la variable menos estudiada entorno al perfil lipídico, aunque también la que muestra mayor sensibilidad a la ingesta de CLA. En efecto, de 4 trabajos de investigación que miden esta variable (7,16,21,26), dos encuentran diferencias significativas en el grupo suplementado con CLA, además siendo en ambos casos el efecto desfavorable. Estos dos trabajos fueron realizados por el mismo grupo investigador (16,21).

Gaullier y colaboradores (16) realizaron un estudio aleatorizado, doble-ciego y controlado por placebo de 12 meses de duración, en el que participaron 180 sujetos (31 hombres y 149 mujeres) sanos, con un IMC comprendido entre 25 y 30 kg/m<sup>2</sup>. Los voluntarios fueron asignados a uno de los tres grupos para que recibieran 4,5g de aceite de oliva (placebo), 4,5g de CLA en forma de ácidos grasos libres (CLA-FFA; 39% *cis*-9, *trans*-11, 41% *trans*-10, *cis*-12) o 4,5g de CLA en forma de triglicéridos (CLA-TAG; 38% *cis*-9, *trans*-11, 38% *trans*-10, *cis*-12). Al inicio de la intervención, todos los sujetos recibieron recomendaciones de los investigadores acerca de una alimentación sana y el ejercicio físico. De los participantes seleccionados, 157 completaron el estudio. Los resultados del análisis bioquímico revelaron un aumento significativo de los niveles séricos de Lp(a) dentro de los dos grupos de tratamiento con CLA respecto a los valores iniciales, siendo también significativo el cambio observado en el grupo CLA-FFA comparado con el grupo control.

Sin embargo, el resultado que obtuvieron Gaullier y colaboradores (26) en su siguiente trabajo discrepó con los anteriores estudios. En este caso, 188 hombres y mujeres sanos con un IMC comprendido entre 28 y 32 kg/m<sup>2</sup> fueron seleccionados para participar en un ensayo paralelo, doble-ciego, aleatorizado y controlado por placebo de 6 meses de duración. Los sujetos fueron asignados a uno de dos grupos para que ingirieran 4,5 g de aceite de CLA (37,5% *cis*-9, *trans*-11 y 38% *trans*-10, *cis*-12) o 4,5 g de aceite de oliva (placebo) diariamente. Los participantes se alimentaron *ad libitum*, aunque recibieron recomendaciones de los investigadores acerca de la alimentación y el ejercicio físico saludables. De los 188 participantes iniciales, solamente 83 sujetos completaron el estudio. Tras 6 meses de suplementación con CLA, se encontraron aumentos marginales pero significativos en los niveles de Lp(a) en ambos grupos CLA y control, aunque no se vieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Además, veinte sujetos que presentaban los niveles de Lp(a) significativamente por encima del rango normal al inicio del estudio, mantuvieron o aumentaron ligeramente los niveles de Lp(a) durante el estudio.

### CONCLUSIONES

Los resultados de los ensayos de intervención nutricional son ambiguos y los potenciales efectos favorables del CLA sobre el perfil lipídico en humanos ofrecen discrepancias y resultados a menudo controvertidos. La disconformidad entre los distintos trabajos de investigación podría probablemente deberse a las diferencias en el diseño experimental. La dosis, la composición de isómeros, el placebo utilizado y la duración del estudio favorecen las discrepancias encontradas entre los distintos trabajos de investigación. Por otro lado, el tamaño muestral, el sexo y el estado nutricional (peso y composición corporal) y fisiopatológico (dislipemia, hipertensión arterial, alteración en el metabolismo glucídico o síndrome metabólico) de los sujetos incluidos, así como la práctica o no de actividad física y el control de la dieta durante la intervención podrían influir en los resultados obtenidos.

Aunque la mayoría de los estudios no halla cambios significativos, destacan dos trabajos de investigación que encuentran cambios beneficiosos en las variables estudiadas que se ven modificadas tras la administración de CLA (16,32). Por lo que, revisados los resultados de los distintos ensayos de intervención nutricional, se puede concluir que los estudios de 12 semanas de duración, realizados con una mezcla en iguales cantidades de los dos isómeros principales de CLA (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12) y con dosis de entre 3 y 4 g ofrecen los resultados más beneficiosos sobre el perfil lipídico en individuos sanos que presentan sobrepeso u obesidad.

### AGRADECIMIENTOS

Al Master Universitario Europeo en Alimentación, Nutrición y Metabolismo (E-MENU) y a la Línea Especial Nutrición, Obesidad y Salud (Universidad de Navarra LE/97) por el apoyo en la investigación en esta área.

### REFERENCIAS

1. Zulet MA, Wabitsch M, Marti A, Martínez JA. Ácido linoleico conjugado y grasa corporal. *Nutr Clin* 2003; 22/85:9-18.
2. Raff M, Tholstrup T, Basu S, Nonboe P, Sørensen MT, Straarup EM. A diet rich in conjugated linoleic acid and butter increases lipid peroxidation but does not affect atherosclerotic, inflammatory, or diabetic risk markers in healthy young men. *J Nutr* 2008; 138:509-514.
3. Hernández ERS, Jácome MMS, Lee RGH, Nakano T, Ozimek L, Guzmán IV. Alto contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y productos derivados al incorporar semillas de girasol a la dieta vacuna. Implicaciones sobre el riesgo trombo/aterogénico. *Arch Latinoamer Nutr* 2007; 57: 173-178.
4. Silveira MB, Carraro R, Monereo S, Tébar J. Conjugated linoleic acid (CLA) and obesity. *Public Health Nutr* 2007; 10:1181-1186.

5. Zulet MA, Marti A, Parra MD, Martínez JA. Inflammation and conjugated linoleic acid: mechanisms of action and implications for human health. *J Physiol Biochem* 2005; 61:483-494.
6. Funck LG, Barrera-Arellano D, Block JM. Conjugated linoleic acid (CLA) and its relationship with cardiovascular disease and associated risk factors. *Arch Latinoam Nutr* 2006; 56:123-134.
7. Blankson H, Stakkestad JA, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J Nutr* 2000; 130:2943-2948.
8. Benito P, Nelson GJ, Kelley DS, Bartolini G, Schmidt PC, Simon V. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids* 2001; 36:229-236.
9. Mougios V, Matsakas A, Petridou A, Ring S, Sagredos A, Melissopoulou A, et al. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J Nutr Biochem* 2001; 12:585-594.
10. Risérus U, Berglund L, Vessby B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int J Obes* 2001; 25:1129-1135.
11. Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans—metabolic effects. *Lipids* 2001; 36:773-781.
12. Noone EJ, Roche HM, Nugent AP, Gibney MJ. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *Br J Nutr* 2002; 88:243-251.
13. Risérus U, Arner P, Brismar K, Vessby B. Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes care* 2002; 25:1516-1521.
14. Petridou A, Mougios V, Sagredos A. Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women. *Lipids* 2003; 38:805-811.
15. Kamphuis MMJW, Lejeune MPGM, Saris WHM, Westerterp-Plantenga MS. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *Int J Obes* 2003; 27:847.
16. Gaullier J, Halse J, Høye K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:1118-1125.
17. Risérus U, Smedman A, Basu S, Vessby B. Metabolic effects of conjugated linoleic acid in humans: the Swedish experience. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:1146-1148.
18. Whigham LD, O'Shea M, Mohede ICM, Walaski HP, Atkinson RL. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. *Food Chem Toxicol* 2004; 42:1701-1709.
19. Tricon S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Jones EL, et al. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:614-620.
20. Moloney F, Yeow T, Mullen A, Nolan JJ, Roche HM. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:887-895.
21. Gaullier J, Halse J, Høye K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, et al. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *J Nutr* 2005; 135:778-784.
22. Desroches S, Chouinard PY, Galibois I, Corneau L, Delisle J, Lamarche B, et al. Lack of effect of dietary conjugated linoleic acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:309-319.
23. Tricon S, Burdge GC, Jones EL, Russell JJ, El-Khazen S, Moretti E, et al. Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:744-753.
24. Taylor JSW, Williams SRP, Rhys R, James P, Frenneaux MP. Conjugated linoleic acid impairs endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:307-312.
25. Steck SE, Chalecki AM, Miller P, Conway J, Austin GL, Hardin JW, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans. *J Nutr* 2007; 137:1188-1193.
26. Gaullier J, Halse J, Høivik HO, Høye K, Syvertsen C, Nurminiemi M, et al. Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. *Br J Nutr* 2007; 97:550-560.
27. Nazare J, de la Perrière AB, Bonnet F, Desage M, Peyrat J, Maitrepierre C, et al. Daily intake of conjugated linoleic acid-enriched yoghurts: effects on energy metabolism and adipose tissue gene expression in healthy subjects. *Br J Nutr* 2007; 97:273-280.
28. Watras AC, Buchholz AC, Close RN, Zhang Z, Schoeller DA. The role of conjugated linoleic acid in reducing body fat and preventing holiday weight gain. *Int J Obes* 2007; 31:481-487.
29. Laso N, Brugué E, Vidal J, Ros E, Arnaiz JA, Carné X, et al. Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid (isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12) on body composition and metabolic syndrome components. *Br J Nutr* 2007; 98:860-867.
30. Tholstrup T, Raff M, Straarup EM, Basu S, Bruun JM. An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *J Nutr* 2008; 138:1445-1451.

Recibido: 29-06-2009

Aceptado: 30-07-2009

## Intervenciones aleatorias controladas basadas en las escuelas para prevenir la obesidad infantil: revisión sistemática de 2006 a 2009

*M.E. Pérez-Morales, M. Bacardí-Gascón, A. Jiménez-Cruz y A. Armendáriz-Anguiano*

Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana B.C., México

**RESUMEN.** La prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños ha incrementado a niveles epidémicos. Diferentes autores sugieren que la escuela puede ser el espacio más apropiado para realizar programas efectivos de prevención. El propósito de esta revisión sistemática fue valorar la evidencia de estudios aleatorios controlados con un periodo de intervención a largo plazo (igual o mayor a 9 meses) en escuelas y publicados en la base de datos de MEDLINE/PubMed del 1° de enero de 2006 hasta el 28 de febrero de 2009. Se analizaron en total 10 artículos. En general, se puede observar una heterogeneidad en el diseño y los componentes de la intervención, la edad del grupo objetivo, el tiempo de intervención, el sistema educativo, las características culturales de la población y los resultados. Estos últimos son modestos. Los resultados indican un cambio positivo en el estilo de vida, incremento en el consumo de frutas y verduras, menor consumo de bebidas carbonatadas y azucaradas, reducción del comportamiento sedentario y reducción en adiposidad. En general no hubo reducción significativa del IMC. Los resultados demandan estrategias para lograr mayor compromiso de los padres y adherencia a los programas, así como más estudios en diferentes sistemas educativos y ambientes culturales, incluyendo los de Latinoamérica. Además se requieren seguimientos a más largo plazo.

**Palabras clave:** Intervenciones aleatorias controladas basadas en las escuelas, obesidad infantil, prevención.

**SUMMARY. Randomized controlled school based interventions to prevent childhood obesity: systematic review from 2006 to 2009.** The prevalence of overweight and obesity in children has increased to epidemic levels. Several authors have suggested that school is the best place for effective prevention programs. The purpose of this systematic review was to assess the evidence of randomized controlled trials concerning long-term (equal to or more than 9 months) observations at schools and published in the database of MEDLINE/Pubmed from January 1<sup>st</sup> of 2006 to February 28 of 2009. Ten studies were analyzed. Overall, regarding the design, the intervention components, target population age, intervention periods, educational techniques, cultural characteristics of the population, and outcome measures were heterogeneous. The results were modest. The outcomes showed a positive impact on lifestyle as intakes of fruits and vegetables increased, consumption of sugar-sweetened carbonated beverages decreased, and sedentary behaviors and adiposity were reduced. Generally, there were no significant reductions for BMI. These results warrant more strategies to achieve parental involvement, reduction of dropouts, and additional studies assessing different educational systems and cultural environments, including those in Latin America. Longer follow-up periods are also required.

**Keywords:** Randomized controlled school based interventions, childhood obesity, prevention.

### INTRODUCCION

En niños y en adultos el sobrepeso y la obesidad han aumentado a niveles epidémicos. La prevalencia de sobrepeso en niños y adolescentes de 6 a 19 años en Estados Unidos ha incrementado el 45% en las dos últimas décadas, pasando del 11 al 16% (1).

La obesidad en niños y adolescentes se ha asociado con hipertensión, dislipidemias, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y otras complicaciones médicas y

psicológicas (2-5). El incremento en sobrepeso y obesidad puede ser atribuido a múltiples factores, como son los factores genéticos, el comportamiento, factores sociales y factores ecológicos. El medio ambiente se reconoce como agente obesigénico en la etiología de la obesidad (6-8). Entre los factores ambientales se considera que el sedentarismo y el aumento en la disponibilidad de alimentos han contribuido a aumentar la prevalencia de la obesidad (9). El sedentarismo en niños y adolescentes ha incrementado debido al auge de los juegos de video, al tiempo destinado a ver televisión, al uso de computadoras y a la inseguridad en las calles (10). Algunos autores consideran que el diseño de los programas orientados a incrementar la actividad física (AF) y reducir el sedentarismo en niños puede ser la opción más viable para prevenir la obesidad (11). También se ha señalado que las

---

Apoyo recibido a través de la Convocatoria Interna de Investigación de la Universidad Autónoma de Baja California.

escuelas son el lugar ideal para llevar a cabo programas de intervención para prevenir la obesidad en niños, ya que es el lugar natural para recibir educación acerca de estilos de vida saludables, se cuenta con personal capacitado y los niños pasan mucho tiempo en las escuelas (12). Eisenmann y cols. (13) y Sallis (14) han sugerido que la intervención en varios ámbitos (la familia, la escuela y la comunidad) puede ayudar a cambiar la conducta hacia estilos de vida saludables, con lo que se podría tener mayor éxito en la prevención de la obesidad infantil.

Sin embargo, los programas de intervención aplicados en las escuelas para prevenir el sobrepeso y obesidad en niños no han dado los resultados esperados. Esto puede ser debido a que es difícil cambiar los hábitos o estilo de vida y el ambiente en el cual se desarrollan los niños, y a la falta de compromiso a largo plazo de los padres (15,16).

Sharma y cols. (17), realizaron una revisión sistemática de programas de intervención para prevenir la obesidad en niños y adolescentes publicados de 1999 a 2004. Se analizaron 11 estudios, el 64% (n=7) se realizaron en escuelas primarias; el 55% (n= 6) se enfocaron en la modificación de la AF y el comportamiento relacionado con la nutrición; el 27% (n=3) se enfocaron en un solo aspecto, como el ver televisión, la restricción de bebidas carbonatadas o el incremento de AF en la escuela. Los resultados de estas intervenciones mostraron cambios pequeños en el comportamiento, dentro de los cuales, el que parece mas efectivo es el destinado a modificar el tiempo destinado a ver televisión, seguido de la AF y de las conductas relacionadas con la nutrición.

En la revisión sistemática publicada en Cochrane (18) sobre estudios de intervenciones de más de un año de seguimiento publicados de 1990 a febrero de 2005, se concluyó que había poca evidencia que respalde las iniciativas basadas en escuelas. Los autores consideran que la mayoría de estudios presentaron errores de análisis, varios presentaron bajo poder estadístico y un enfoque inadecuado respecto al comportamiento. Por lo que recomendaron hacer intervenciones más intensas y de mayor duración, usar una metodología más rigurosa y considerar la sustentabilidad de las intervenciones (19).

El propósito de este artículo es llevar a cabo una revisión sistemática de artículos de estudios aleatorios controlados de programas de intervención en escuelas para prevenir el sobrepeso y obesidad en niños, con un periodo de intervención mayor o igual a 12 meses, publicados en la base de datos de MEDLINE/PubMed del 1° de enero de 2006 hasta el 28 de febrero de 2009.

## MÉTODOS

Se revisaron todos los artículos originales encontrados en inglés y en español publicados en la base de datos de MEDLINE/PubMed del 1° de enero de 2006 al 28 de febrero

de 2009, de estudios aleatorios controlados con una duración igual o mayor de 9 meses, de programas de intervención en escuelas para prevenir el sobrepeso y/o obesidad en niños de 6 a 12 años de edad. Se realizó la búsqueda con las palabras clave: “school-based interventions, childhood overweight, childhood obesity, prevention”. Se incluyeron otros artículos referidos en artículos originales o de revisión. La calidad de los artículos fue evaluada mediante los criterios de Atkins y cols. (20). De acuerdo a estos criterios todos los estudios aleatorios tienen una calificación máxima de 4. Se le resta un punto cuando: a) Se encuentren diferencias iniciales entre el grupo control y el de intervención (peso, IMC, porcentaje de grasa, edad, prevalencia de sobrepeso u obesidad), b) Un nivel de deserción al final del estudio mayor de 30%, c) El grupo no fue analizado por intención de tratar, d) Incertidumbre en la dirección (validación de los instrumentos para evaluar las variables dependientes cuestionables), e) Datos muy dispersos (alta desviación estándar), f) Alta probabilidad de reporte de sesgos (muestra, características de la población), g) Inconsistencias internas (datos, números). Se le restan dos puntos cuando se encuentren: a) Limitaciones serias en el diseño (muestreo, características de la población), b) Limitaciones serias de dirección (validación de los instrumentos para evaluar las variables dependientes cuestionables). Se le aumenta un punto cuando se tengan: a) Asociaciones fuertes sin posibilidad de variables de confusión, consistente y evidencia directa, b) Todas las posibles variables de confusión disminuyeron el tamaño del efecto. Los artículos fueron evaluados por dos investigadores independientes (MEPM y ALAA). Cuando no hubo consistencia se reunieron con otros dos investigadores (MBG y AJC) y se logró un consenso.

## RESULTADOS

Se encontraron 22 artículos sobre programas de intervención en escuelas para prevenir el sobrepeso y obesidad en niños, de los cuales se eliminaron cinco porque presentaban sólo el diseño del estudio y datos iniciales; dos porque eran estudios piloto; dos porque no eran estudios aleatorios, uno porque la intervención se llevó a cabo en la comunidad; otro porque se realizó en un centro de atención primaria; y uno que se llevó a cabo en la familia. Se analizaron en total 10 artículos que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para esta revisión. Estos 10 estudios se realizaron en los siguientes países: España, Estados Unidos, Brasil, China, Inglaterra, Alemania, Francia, Austria, y dos en Noruega (Tabla 1).

TABLA 1  
Estudios aleatorios controlados de programas de intervención en escuelas para prevenir sobrepeso y obesidad en niños de 6 a 12 años de edad

Referencia	N (Escuelas)	Promedio de edad años (rango)	Promedio IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Intervención	PI años escolares	PS (años)	Adherencia al Programa (%)	Diferencia de Peso(kg) o IMC	Comparación entre I y C (valor de p)	Calidad (20) y limitaciones
Martínez y cols. 2008 (21)	1044 (20)	9.4 (9-10)	Niños C: 18.6 I: 18.4 Niñas C: 18.5 I: 18.7	Después del horario de clases, tres sesiones de 90 minutos de actividad física moderada por semana. durante 24 semanas	1	0	91	Niños 0.07 Niñas -0.12	0.45 0.22	3 No ciego a medidas antropométricas y presión arterial.
Foster y cols. 2008 (22)	1349 (10)	11.20 (10-12)	C: 20.8 I: 21.1	Política de nutrición en las escuelas: educación nutricional, valoración del ambiente en las escuelas, campaña de socialización, participación de los padres.	2	0	63	C: 2.10 I: 1.99	0.71	2 Baja adherencia, no ciego al tratamiento, diferencia en grupos
Sichieri y cols. 2009 (23)	1140 (22)	10.9 (9-12)	C: 18.2 I: 18.3	Programa enfocado a disminuir la ingesta de bebidas carbonatadas y azucaradas, y prevenir el aumento del exceso de peso.	1	0	C: 81 I: 82	C: 0.22 I: 0.32	0.33	2 Tamaño de muestra, instrumentos utilizados.
Jiang y cols. 2007 (24)	2425 (5)	8.4 (7-10)	C: 17.5 I: 17.6	Programa de educación en nutrición y actividad física dirigido a padres e hijos.	3	0	90	C: 2.8 I: 0.6	<0.01	2 No ciego a medidas antropométricas y no fue analizado por intención de tratar.
James y cols. 2007 (25)	434 (6)	8.6 (7-11)	C: 17.5 I: 17.2	Valorar el efecto a largo plazo de un proyecto de intervención de un año: enfocado a promover una dieta saludable y disminuir el consumo de bebidas carbonatadas.	1	2	67	C: 2.14 I: 1.88	0.03	2 Bajo poder estadístico, baja adherencia, error tipo II
Plachta-Danielzik y cols. 2007 (26)	1764 (32)	6.3 (6-6.5)	C: 15.4 I: 15.6	Dirigido a niños de primer grado, Seis unidades sobre Nutrición durante 2 a 3 semanas. Después de cada unidad durante 20 min juegos de carreras.	4	0	44	C: 1.8 I: 1.7	<0.05	1 Sesgos por validez externa, bajo poder estadístico, baja adherencia.
Simon y cols. 2008 (27)	954 (8)	11.6 (9.9-13.8)	C: 18.9 I: 18.7	Programa de educación en nutrición y de actividad física. Eventos deportivos con participación de padres y maestros.	4	0	77	C: 2.42 I: 2.38	0.01	3 Diferencias iniciales en SES, colección de datos no ciegos.
Salmon y cols. 2007 (28)	306 (3)	10.8 ±4 (10-11)	Niños 3.4* Niñas 2.6*	Selección aleatoria de cuatro grupos: Modificación de comportamiento, habilidades fundamentales de movimiento, grupo combinado, grupo control.	1	1	88	ND	ND	3 Bajo poder estadístico, forma de aleatorización.
Bere y cols. 2006 (29)	450 (19)	11.3	ND	Programa de educación nutricional para aumentar el consumo de frutas y verduras. Programa de fruta a bajo costo en la escuela.	1	1	69	ND	ND	1 No fue analizado por intención de tratar, no reporta poder estadístico, baja adherencia.
Bere y cols. 2006 (30)	517 (19)	11.3	ND	Programa de educación nutricional. Para aumentar el consumo de frutas y verduras sin costo para los padres.	1	1	84	ND	ND	2 No fue analizado por intención de tratar, no reporta poder estadístico.

IMC= Índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>); C= Control; I= Intervención; PI= Periodo de intervención; PS= Periodo de seguimiento posterior al final de la intervención. \* ajustado a sexo y edad.

### Intervenciones

Martínez y cols. (21) realizaron un estudio para evaluar el impacto de la AF sobre la obesidad en niños de escuelas primarias de la Provincia de Cuenca, España (Tabla 1). El programa de AF se aplicó durante un año escolar y consistió en tres sesiones de 90 minutos por semana. Se realizaron durante 24 semanas, después del horario de clases. La AF fue planeada por dos profesores de educación física calificados. Al final del programa no se observó diferencia significativa del IMC entre el grupo de intervención y el control, sin embargo se registraron reducciones en pliegues subcutáneos (PS) en ambos sexos. Comparado con el grupo control la reducción en el grupo de intervención fue de -1.14 mm en niños (95% IC -1.71 a -0.57;  $p < 0.001$ ) y de -1.55 mm en niñas (95% IC -2.38 a -0.73;  $p < 0.001$ ). La reducción en el porcentaje de grasa corporal en niñas fue de -0.58% (95% IC -1.04 a -0.11;  $p = 0.02$ ), lo que sugiere una disminución discreta de la adiposidad. Este estudio presenta varias limitaciones, se realizó exclusivamente en escuelas rurales por lo que se deberían confirmar los resultados en escuelas urbanas. El tiempo de intervención fue de un año escolar, por lo que no es posible valorar la adherencia y efectividad en un período mayor. La colección de datos de presión arterial y medidas antropométricas no fueron ciegos.

Foster y cols. (22) evaluaron en Estados Unidos el efecto de una política nutricional para la prevención de sobrepeso y obesidad en las escuelas (Tabla 1). La política incluyó los siguientes componentes: 1) auto valoración de las escuelas, 2) educación nutricional, 3) política nutricional, 4) campaña de socialización, y 5) participación de los padres. Este estudio se realizó y evaluó durante dos años. Se observó que menos niños del grupo de intervención adquirieron sobrepeso (7.5% vs. 14.9%). Los resultados ajustados demostraron una menor incidencia de sobrepeso (~33%) en el grupo de intervención (OR: 0.67; 95% IC: 0.47-0.96;  $p < 0.05$ ). Sin embargo no se observaron diferencias en la incidencia de obesidad. Además, la intervención no tuvo efecto sobre el IMC. Al valorar conjuntamente el sobrepeso y la obesidad (percentil  $a > 85$ th) la incidencia fue de aproximadamente 15% menor en el grupo de intervención (OR: 0.85; 95% IC: 0.74 a 0.99;  $p < 0.05$ ). Ajustado al género, la raza y la edad, el comportamiento sedentario disminuyó en un 5% (OR: 0.95; 95% IC: 0.93-0.97;  $p < 0.0001$ ). Estos datos demuestran un descenso promedio en la incidencia de sobrepeso en el grupo de intervención de ~50%; sin embargo, a pesar de ésta la incidencia aumentó 7.5% a los dos años, lo que sugiere que hay individuos que requieren otro tipo de intervención o que a esa edad ya están programados para adquirir sobrepeso. El uso de cuestionarios auto-administrados de ingesta dietética y AF que no han sido validados mediante métodos directos limita los resultados de este estudio. El número de escuelas y de participantes en este estudio fueron a conveniencia, por lo que no representan la

población general de la región, lo que hace que la generalización a otras escuelas u otras condiciones (infraestructura humana, material y económica), puede estar limitada. Además, en este estudio no se valoraron otras medidas antropométricas (circunferencia de cintura) y bioquímicas, glucosa, insulina), que hubiesen sido de valor para determinar el efecto sobre otros criterios de riesgo metabólico.

El estudio de Sichieri y cols. (23), realizado en Brasil, consistió en un programa que tenía el propósito de disminuir el consumo de bebidas carbonatadas y azucaradas por parte de los niños de 9 a 12 años y prevenir el aumento del exceso de peso (Tabla 1). Este estudio se realizó y evaluó durante un año. Al final del estudio, el consumo de bebidas carbonatadas disminuyó en ambos grupos. En el grupo de intervención la reducción fue de 69.0 ml/día y en el grupo control de 13.0 ml/día ( $p = 0.03$ ). Entre los grupos no se observaron diferencias significativas en la reducción del IMC ( $p = 0.33$ ). En el grupo de intervención los participantes con sobrepeso tuvieron una mayor disminución del IMC (-0.4 kg/m<sup>2</sup>) que en el grupo control (-0.2 kg/m<sup>2</sup>) ( $p = 0.11$ ). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas solamente en las niñas ( $p = 0.009$ ). Las principales limitaciones del estudio son que no fue ciego y no hubo validación de los instrumentos de recolección de información. Como fue el uso de un único recordatorio de 24 hr. para valorar la ingesta de alimentos. Aunque un recordatorio de 24 hr. provee una buena estimación de la ingesta de un grupo, no permite valorar las variaciones diarias de los individuos.

Jiang y cols. (24) realizaron en China un estudio de intervención para prevenir la obesidad en niños en edad escolar durante tres años (Tabla 1). En el grupo de intervención se involucraron en el programa a los niños y a los padres. El grupo control siguió con el programa regular de la escuela. Al finalizar el estudio, la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue significativamente menor en las escuelas de intervención cuando se comparó con el grupo control (sobrepeso 9.8% vs. 14.4%,  $p < 0.01$ ; obesidad 7.9% vs. 13.3%,  $p < 0.01$ ). La prevalencia de sobrepeso y obesidad disminuyó un 26.3% y un 32.5% respectivamente en las escuelas de intervención. La prevalencia de sobrepeso y obesidad aumentó en las escuelas control (14.3% y 15.7% respectivamente). También hubo diferencia significativa en el IMC entre el grupo de intervención y el control ( $18.2 \pm 2.6$  vs.  $20.3 \pm 3.4$ ,  $p < 0.01$ ). Las limitaciones de este estudio fueron un número bajo de escuelas y el que no se valoró la ingesta dietética, la AF y el comportamiento relacionado con la obesidad. No hubo colección de datos ciegos y no se realizó el análisis de los datos por intención de tratar.

James y cols. (25) evaluaron el efecto a largo plazo de un programa de prevención de la obesidad en escuelas. Este estudio se realizó en Inglaterra, el periodo de intervención

fue de un año y el seguimiento fue a los dos años después de la intervención (Tabla 1). Este consistió en un programa de educación que estaba dirigido a promover una dieta saludable y a disminuir el consumo de bebidas carbonatadas. A los tres años el puntaje z de IMC (SD) aumentó en el grupo control,  $0.10 \text{ kg/m}^2$  y disminuyó en el grupo de intervención  $-0.01 \text{ kg/m}^2$ , con una diferencia promedio de  $0.10 \text{ kg/m}^2$  ( $p=0.06$ ). El IMC incrementó en el grupo control  $2.14 \text{ kg/m}^2$  y en el de intervención de  $1.88 \text{ kg/m}^2$ , con una diferencia promedio de  $0.26 \text{ kg/m}^2$  ( $-0.07$  a  $0.58$ ,  $p=0.12$ ). La circunferencia de cintura incrementó en ambos grupos después de los tres años con una diferencia promedio de  $0.09 \text{ cm}$  ( $-0.06$  a  $0.26$ ,  $p=0.25$ ). Debido al avance de los niños en los niveles escolares, los grupos originales cambiaron y se utilizó un método de análisis diferente al propuesto inicialmente, no se realizó la valoración del efecto del consumo de alimentos ni de bebidas carbonatadas.

Plachta-Danielzik y cols. (26) realizaron en Alemania un estudio de seguimiento de cuatro años para evaluar los resultados de un programa de prevención de la obesidad (Tabla 1). El cambio en el IMC a los cuatro años fue de  $+11.6\%$ , con incrementos de  $5.2\%$  al  $11.1\%$  en la prevalencia de sobrepeso y del  $3.9\%$  al  $5.1\%$  en obesidad. La incidencia acumulada de sobrepeso y obesidad fue del  $9.2\%$  y  $3.1\%$  respectivamente. No se observaron diferencias en el promedio de IMC. Sin embargo, en las familias de alto nivel socio económico, el efecto sobre la prevalencia fue significativo (OR,  $0.35$ ;  $95\%$  IC,  $0.14$  a  $0.91$ ;  $p=0.031$ ). Además, la incidencia acumulada de sobrepeso a los cuatro años fue mas baja en ese grupo (OR,  $0.26$ ;  $95\%$  IC,  $0.07$  a  $0.87$ ;  $p=0.030$ ). Por otro lado, la remisión de sobrepeso fue mas pronunciada en niños con madres de peso normal (OR,  $5.43$ ;  $95\%$  IC,  $1.28$  a  $23.01$ ;  $p=0.022$ ) y la intervención tuvo un efecto ligero en el estilo de vida. La principal fortaleza de este estudio es haber sido uno de los de mayor seguimiento. Sin embargo, entre las limitaciones principales de este estudio fue la baja adherencia ( $44\%$ ), el bajo poder estadístico y sesgos en la validez externa.

En Francia, Simon y cols. (27) realizaron un programa de cuatro años para promover la actividad física en alumnos de  $6^\circ$  grado y prevenir el sobrepeso (Tabla 1). El programa de intervención fue abierto, y gratuito. Tenía como objetivos cambiar tres entornos mediante: 1) el cambio de actitudes sobre la actividad física, 2) la promoción del apoyo social por parte de los padres y maestros, y 3) cambios en las condiciones ambientales e institucionales para que los alumnos apliquen los conocimientos y habilidades adquiridas sobre AF. Al final del estudio, los estudiantes del grupo de intervención mostraron un incremento menor de IMC que el grupo control ( $p=0.01$ ), ajustado a la edad y género ( $p<0.02$ ). El IMC a los cuatro años de intervención fue de  $21.08 \text{ kg/m}^2$  en el grupo de intervención y de  $21.32 \text{ kg/m}^2$  en el grupo control. La incidencia acumulativa de sobrepeso fue menor en el grupo

de intervención que en el grupo control ( $p<0.01$ ). A los cuatro años el  $4.2\%$  de los estudiantes que inicialmente tenían peso normal presentaron sobrepeso en las escuelas de intervención, comparadas con el  $9.8\%$  en las escuelas control. A los cuatro años, el  $79\%$  del grupo de intervención practicaban al menos una AF supervisada fuera de la escuela, comparado con el  $47\%$  del grupo control ( $p<0.001$ ). La AF supervisada incrementó en el grupo de intervención y decreció ligeramente en el grupo control, con una diferencia entre los grupos de  $66 \text{ min/semana}$  ( $p<0.0001$ ). La fortaleza del estudio fue el tiempo de seguimiento, la evaluación de la actividad física y la consistencia entre los cambios de AF, el cambio de IMC, y la incidencia acumulada del sobrepeso. Ente las limitaciones observadas en este grupo están las diferencias iniciales en SES, colección de datos no ciegos y la imposibilidad para determinar los componentes del programa que fueron efectivos.

Salmon y cols. (28) realizaron en Australia un estudio con el objetivo de evaluar la efectividad de una intervención para prevenir el aumento del exceso de peso, reducir el tiempo destinado frente a la pantalla (TV, computadora, juegos electrónicos), promover la participación y disfrutar la actividad física, y mejorar las habilidades fundamentales de movimiento en los niños (Tabla 1). El estudio se realizó en una zona de nivel socioeconómico bajo. Los alumnos se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos: 1) modificación de comportamiento (MC;  $n=66$ ); 2) habilidades básicas de los movimientos (HBM;  $n=74$ ); 3) grupo combinado (MC/HBM;  $n=93$ ); y 4) grupo control ( $n=62$ ). En el grupo combinado al compararse con el GC ( $-1.88 \text{ kg/m}^2$ ,  $p<0.01$ ) se observó un efecto significativo que se mantuvo a los 6 y 12 meses de seguimiento ( $-1.53 \text{ kg/m}^2$ ,  $p<0.05$ ). Los niños del grupo combinado MC/HBM fueron menos propensos ( $60\%$ ) a tener sobrepeso/obesidad que el grupo control a los 6 meses y a los 12 meses. Mediante el grupo MC, que se pretendía modificar el tiempo frente a la pantalla se observó un aumento ( $229 \text{ min/semana}$ ) de tiempo destinado a ver la TV al compararse con el grupo control. Se presentaron varias limitaciones en este estudio. De acuerdo a los autores mediante la forma de aleatorización pudo haber contaminación entre el grupo de intervención y el de control. El uso de cuestionarios auto-administrados para determinar el comportamiento frente a la pantalla. Además no se determinó estado pubertal de los niños, por lo tanto pudieron estar en diferentes niveles de madurez entre los grupos, lo que pudo afectar los resultados. Una limitación del grupo de intervención de MC fue que el comportamiento frente a la pantalla se realizaba en las casas y que los padres no estaban al pendiente de estas actividades.

En el condado de Telemark (Noruega), Bere y cols. (29) evaluaron el efecto de un programa dirigido a aumentar el consumo de frutas y verduras (FV). La intervención duró un año y los resultados se evaluaron dos años después del inicio (Tabla 1). La intervención se basó en la teoría social cognitiva

y consistió en la modificación de tres componentes: 1) educación en salón de clases, 2) involucramiento de los padres, y 3) programa de FV a bajo costo en la escuela. Al final del programa no se observó un efecto positivo sobre el consumo de FV consumidos en la escuela o fuera. Se encontró mayor concientización sobre el consumo de cinco FV al día ( $p=0.01$ ). Una limitación de este estudio fue la falta de análisis de los datos por intención de tratar.

Otro estudio fue realizado por los mismos autores en Noruega (Bere y cols.) (30) en otro condado, el de Hedmark. El estudio de intervención consistió en inscribir aleatoriamente a las escuelas participantes en un programa de escuelas de Noruega de promoción de Frutas y verduras sin costo para los padres y en un programa de educación nutricional. En el primer año el 100% de los alumnos del grupo de intervención participaron en el programa de FV sin costo para los padres, comparado con el 11% del grupo control. En el segundo año bajó al 31% y 7% respectivamente. Al principio no hubo diferencias entre los grupos de intervención y control en el consumo de FV en la escuela y fuera. A un año de seguimiento se encontró un efecto muy fuerte en el consumo de FV en el grupo de intervención en la escuela ( $p<0.001$ ) y fuera de la escuela ( $p=0.02$ ). Los resultados positivos obtenidos en este estudio fueron debido a que se les daba una fruta diaria a los niños sin costo para los padres. Entre las limitaciones de este estudio esta la falta del análisis de datos por intención de tratar y la falta de evaluación a largo plazo, después del período de intervención.

## DISCUSION

En esta revisión sistemática, se analizaron 10 estudios aleatorios controlados, publicados de 2006 a 2009 sobre programas de intervención en escuelas para prevenir el sobrepeso y la obesidad en niños de 6 a 12 años, con una duración igual o mayor a 12 meses. Cuatro estudios se basaron en programas de educación nutricional (23,25,29,30), y los resultados no demostraron diferencias significativas en la reducción general del IMC. En dos estudios se observaron reducciones en el consumo de bebidas carbonatadas y azucaradas, -56 ml (23,25) y en dos se mostraron cambios en el comportamiento respecto a la concientización de consumir frutas y verduras (29,30). En un estudio no se observaron diferencias en el IMC pero se reportaron reducciones en el grupo de intervención en pliegues subcutáneos y en el porcentaje de grasa corporal. Cuatro estudios incluyeron los componentes de educación nutricional y de AF (24,26-28). En el estudio realizado en China (24) se observó, después de tres años, que la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue significativamente menor en el grupo de intervención que en el de control. En el estudio realizado en los EEUU (22), se observó que menos niños (7.5%) del grupo de intervención

que los del grupo control (14.9%) adquirieron sobrepeso, pero no se observó diferencia en la incidencia de obesidad, y el comportamiento sedentario disminuyó en un 5% en el grupo de intervención. En cuanto al periodo de intervención el 60% ( $n=6$ ) de los estudios duraron un período escolar (9 meses). Uno tuvo una duración de dos años, uno de tres años y dos estudios tuvieron una duración de cuatro años de intervención.

En los dos estudios con evaluación a más largo plazo (cuatro años) los resultados no fueron consistentes. En el estudio realizado en Alemania, después de cuatro años, no se observaron efectos significativos sobre el IMC pero si se observaron diferencias en estilo de vida, en las familias de alto nivel SE y en los hijos de madres con peso normal (26). En el estudio realizado en Francia se observó diferencia estadística en IMC entre el grupo control y el de intervención. El cambio más significativo fue el cambio en la AF (27). En el estudio realizado en Noruega, con una evaluación a dos años del inicio del programa se observó mayor concientización en el consumo de FV, pero no hubieron cambios en el consumo.

En general, se puede observar una heterogeneidad en el diseño y componentes de la intervención, la edad del grupo objetivo, el tiempo de intervención, el sistema educativo y las características culturales de la población y los resultados. Los resultados son discretos principalmente relacionados con mejoría general de estilo de vida (26), incremento en el consumo de frutas y verduras (29,30), menor consumo de bebidas carbonatadas y azucaradas (23,25), reducción del comportamiento sedentario (22), y reducción en la adiposidad (21). La falta de un efecto sobre la reducción del IMC fue consistente. Las principales limitaciones que se encontraron fueron el tiempo de seguimiento y la intensidad de las intervenciones, la falta de ceguedad en la colección de datos (21,22-24,27), el insuficiente número de escuelas en los grupos de intervención y control (21,23), la falta de valoración de la ingesta dietética y de la AF (23), el uso de cuestionarios auto-administrados (28), y la baja adherencia en algunos estudios. Por otro lado, aunque existen en la literatura diversos estudios no aleatorios que han demostrado resultados también modestos, el propósito de este estudio ha sido valorar la calidad y los resultados de los estudios incluidos en el mayor nivel de evidencia y en trabajos con resultados a largo plazo.

Otro resultado ha sido la falta de estudios realizados en Latinoamérica durante el período de recolección de datos. Algunos autores han sugerido que los hallazgos negativos de algunos estudios pueden ser debido al poco involucramiento de la familia (23). Por lo que se sugiere evaluar estrategias para lograr mayor compromiso de los padres, mayor adherencia a los programas, y estudios en diferentes sistemas educativos y en poblaciones con distintas culturas y actitudes hacia la salud y la prevención, seguimientos a más largo plazo y que incluyan modificaciones de diversos entornos ambientales.

## REFERENCIAS

1. Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA*. 2004; 291(23): 2847-50.
2. Reilly JJ, Methven E, McDowell ZC, Hacking B, Alexander D, Stewart L, et al. Health consequences of obesity. *Arch Dis Child*. 2003; 88(9): 748-52.
3. Hakanen M, Lagström H, Kaitosaari T, Niinikoski H, Nantö-Salonen K, Jokinen E, et al. Development of overweight in an atherosclerosis prevention trial starting in early childhood. The STRIP study. *Int J Obes*. 2006; 30(4): 618-26.
4. Robinson TN, Kraemer HC, Matheson DM, Obarzanek E, Wilson DM, Haskell WL, et al. Stanford GEMS phase 2 obesity prevention trial for low-income African-American girls: design and sample baseline characteristics. *Contemp Clin Trials*. 2008; 29(1):56-69.
5. Velasco-Martínez RM, Jiménez-Cruz A, Higuera Domínguez F, Domínguez de la Piedra E, Bacardí-Gascón M. Obesidad y Resistencia a la Insulina en Adolescentes de Chiapas. *Nutrición Hospitalaria*. 2009; 24(2): 151-6.
6. Brug J, van Lenthe FJ, Kremers SPJ. Revisiting Kurt Lewin: How to Gain Insight into Environmental Correlates of Obesogenic Behaviors. *Am J Prev Med*. 2006;31(6):525-9.
7. Kremers SP, de Bruijn GJ, Visscher TL, van Mechelen W, de Vries NK, Brug J. Environmental influences on energy balance-related behaviors: a dual-process view. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2006; 3:9.
8. Jansen W, Raat H, Zwanenburg EJ, Reuvers I, Walsem R, Brug J. A school-based intervention to reduce overweight and inactivity in children aged 6-12 years: study design of a randomized controlled trial. *BMC Public Health*. 2008; 8:257.
9. Zahner L, Puder JJ, Roth R, Schmid M, Guldemann R, Pühse U, et al. A school-based physical activity program to improve health and fitness in children aged 6-13 years ("Kinder-Sportstudie KISS"): study design of a randomized controlled trial [ISRCTN15360785]. *BMC Public Health*. 2006; 6:147.
10. French SA, Story M, Jeffery RW. Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health*. 2001; 22:309-35.
11. Doak CM, Visscher TL, Renders CM, Seidell JC. The prevention of overweight and obesity in children and adolescents: a review of interventions and programs. *Obes Rev*. 2006; 7(1):111-36.
12. Pyle SA, Sharkey J, Yetter G, Felix E, Furlong MJ, Poston WS. Fighting an epidemic: the role of schools in reducing childhood obesity. *Psychology in the Schools*. 2006; 43(3): 361-376.
13. Eisenmann JC, Gentile DA, Welk GJ, Callahan R, Strickland S, Walsh M, et al. SWITCH: rationale, design, and implementation of a community, school, and family-based intervention to modify behaviors related to childhood obesity. *BMC Public Health*. 2008; 8:223.
14. Sallis JF, Owen N. Ecological models of health behavior. In: Glanz K, Rimer BK, Lewis FM, eds., *Health behavior and health education: theory, research, and practice*. 3<sup>rd</sup> ed. San Francisco: Jossey-Bass. 2002; 462-84.
15. Katz DL, O'Connell M, Yeh M, Nawaz H, Nijke V, Anderson LM: Public health strategies for preventing and controlling overweight and obesity in school and worksite settings: A report on recommendations of the Task Force on Community Preventive Services. *MMWR Recomm Rep*. 2005; 54(RR-10):1-12.
16. Peterson KE and Fox MK. Addressing the Epidemic of Childhood Obesity Through School-Based Interventions: What Has Been Done and Where Do We Go From Here? *J Law Med Ethics*. 2007; 35(1):113-30.
17. Sharma M. School-based interventions for childhood and adolescent obesity. *The International Association for the Study of Obesity*. *Obes Rev*. 2006; 7(3): 261-9.
18. Summerbell CD, Waters E, Edmunds LD, Kelly S, Brown T, Campbell KJ. Interventions for preventing obesity in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, Issue 3. Art. No.: CD001871. DOI: 10.1002/14651858.CD001871.pub2.
19. Kropski JA, Keckley PH, Jensen GL. School-based Obesity Prevention Programs: An Evidence-based Review. *Obesity*. 2008;16(5):1009-18.
20. Atkins D, Briss PA, Eccles M, Flottorp S, Guyatt GH, Harbour RT, et al. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations II: pilot study of a new system. *BMC Health Serv Res*. 2005; 5(1):25.
21. Martínez Vizcaíno V, Salcedo Aguilar F, Franquelo Gutiérrez R, Solera Martínez M, Sánchez López M, Serrano Martínez S, et al. Assessment of an after-school physical activity program to prevent obesity among 9- to 10-year-old children: a cluster randomized trial. *Int J Obes*. 2008; 32(1):12-22.
22. Foster GD, Sherman S, Borradaile KE, Grundy KM, Vander Veur SS, Nachmani J, et al. A policy-based school intervention to prevent overweight and obesity. *Pediatrics* 2008;121(4):e794-802.
23. Sichieri R, Trotte AP, Souza RA, Veiga GV. School randomized trial on prevention of excessive weight gain by discouraging students from drinking sodas. *Public Health Nutr*. 2009;12(2):197-202.
24. Jiang J, Xia X, Greiner T, Wu G, Lian G, Rosenqvist U. The effects of a 3-year obesity intervention in schoolchildren in Beijing. *Child Care Health Dev*. 2007; 33(5): 641-6.
25. James J, Thomas P, Kerr D. Preventing childhood obesity: two-year follow-up results from the Christchurch obesity prevention program in schools (CHOPPS). *BMJ*. 2007; 335(7623): 762.
26. Plachta-Danielzik S, Pust S, Asbeck I, Czerwinski-Mast M, Langnaese K, Fischer C, et al. Four-year Follow-up of School-based Intervention on Overweight Children: The KOPS Study. *Obesity*. 2007; 15(12): 3159-69.
27. Simon C, Schweitzer B, Oujaa M, Wagner A, Arveiler D, Tribby E, et al. Successful overweight prevention in adolescents by increasing physical activity: a 4-year randomized controlled intervention. *Int J Obes*. 2008; 32(10): 1489-98.
28. Salmon J, Ball K, Hume C, Booth M, Crawford D. Outcomes of a group-randomized trial to prevent excess weight gain, reduce screen behaviours and promote physical activity in 10-year-old children: Switch-Play. *Int J Obes*. 2008;32(4):601-12.
29. Bere E, Veierød MB, Bjelland M, Klepp K-I. Outcome and process evaluation of a Norwegian school-randomized fruit and vegetable intervention: Fruits and Vegetables Make the Marks (FVMM). *Health Educ Res*. 2006; 21(2):258-67.
30. Bere E, Veierød MB, Bjelland M, Klepp K-I. Free school fruit-sustained effect 1 year later. *Health Educ Res*. 2006; 21(2):268-75.

Recibido: 23-04-2009

Aceptado: 16-07-2009

## Estado nutricional en la telarquia y menarquia de adolescentes chilenas indígenas y no indígenas

Hugo Amigo, Thais Costa Machado, Patricia Bustos

Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Programa de Doctorado en Salud Pública, Facultad de Salud Pública, Universidad de São Paulo, Brasil

**RESUMEN.** Se ha señalado que existiría un efecto compensatorio de la desnutrición crónica que induce al exceso de peso y esto sería más evidente en poblaciones indígenas. El objetivo de este trabajo fue establecer la asociación entre etnia indígena (mapuche) y composición corporal en telarquia y menarquia de indígenas y no indígenas. Mediante un diseño transversal, que se inició con un tamizaje de 10.192 niñas de 168 escuelas de la región de la Araucanía en Chile, para identificar 230 adolescentes en telarquia (estadio II de desarrollo de la glándula mamaria): 112 indígenas y 118 no indígenas y 239 en menarquia: 113 indígenas y 126 no indígenas, a quienes se evaluó el índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura (CC), masa magra (MM) y grasa (MG). El IMC, CC y MM fueron mayores en indígenas en telarquia ( $p < 0,001$ ). En menarquia las diferencias disminuyeron alcanzando valores mayores en indígenas sólo en IMC y MG ( $p = 0,04$  y  $0,02$ ). Mediante regresión lineal, se observó que pertenecer a la etnia mapuche aumentó el IMC en 0,37 puntajes z, 95% intervalo de confianza (IC): 0,17-0,58 en telarquia y en 0,44 puntajes z (IC: 0,18-0,70) en menarquia. El ser mapuche se asoció a tener mayor CC, 3,33 cm (IC: 1,67-4,99) en telarquia y 3,17, (IC: 0,73 -5,60) en menarquia, esta procedencia se asocia también a mayor porcentaje de masa magra en telarquia, 1,3 (IC: 0,11-2,43) y mayor masa grasa en menarquia: 2,4 (IC: 1,02- 3,77). Los indicadores de composición corporal en adolescentes indígenas son preocupantes y sugieren que existan programas de fomento de estilos de vida saludable, aprovechando recursos existentes.

**Palabras clave:** Telarquia, menarquia, composición corporal, estado nutricional, indígenas.

**SUMMARY. Nutritional status in telarche and menarche in indigenous and non indigenous Chilean adolescents.** A compensatory effect of chronic malnutrition that influences excess of weight has been reported. This effect would be more evident in indigenous populations. The aim of this study was to find out the association between ethnic group (mapuche) and body composition in the telarche and menarche of indigenous and non indigenous adolescents. This was a cross sectional design. At the beginning, a screening of 10,121 girls from 168 schools in the Araucania Region, Chile was done. 230 adolescent in telarche (grade II of the development of the mammary gland) :112 indigenous and 118 non indigenous and 239 in menarche (113 indigenous and 126 non indigenous) were identified. Body mass index (BMI), waist circumference (WC), lean mass (LM) and fat mass (FM) were evaluated. BMI, WC and LM were higher in the indigenous adolescent in telarche. For those with menarche, the differences decreased, reaching with higher values for indigenous girls only in BMI and FM ( $p = 0,04$  and  $0,02$ , respectively). Belonging to the indigenous group increased the BMI in 0.37 z scores in telarche (95% CI: 0,17-0,58) and 0,44 in menarche (95% CI:0,18-0,70). Being mapuche was also associated to higher WC: 3.33 cm (CI 1,67 - 4,99) in telarche and 3,17 cm (CI 0,73-5,60) in menarche and to higher lean mass only for those adolescents with telarche (1,3 CI: 0,11-2,43) and to fat mass only for those with menarche (2,4 CI: 1,02-3,77). The body composition indicators in indigenous adolescents are of concern and underscores the importance of programs to promote healthy lifestyles that take into account resources from the indigenous communities.

**Key words:** Telarche, menarche, body composition, nutritional status, indigenous.

### INTRODUCCION

La pubertad es un proceso fisiológico de maduración hormonal y crecimiento somático que permite que el organismo de la mujer este apto para la reproducción. Las modificaciones que ocurren en esta etapa se inician con cambios hormonales que determinan la aparición de las características sexuales secundarias, cambios en la distribución de masa corporal grasa y magra, aceleración de la velocidad de crecimiento en longitud y finalmente la fusión de las epífisis con las diáfisis óseas determinando el cese del crecimiento (1).

Se ha descrito una relación entre la maduración sexual y la distribución del tejido adiposo durante la adolescencia (2), existiendo evidencias de que la maduración sexual precoz constituye un factor de riesgo para un mayor porcentaje de grasa corporal, obesidad y enfermedades crónicas (3-6).

Existen algunos estudios sobre estado nutricional y composición corporal en escolares indígenas que ingresan a la escuela básica y/o en adolescentes de esta procedencia. En estos estudios se ha descrito la existencia de déficit de crecimiento y bajo peso y en algunas oportunidades el déficit de talla se acompaña de obesidad (7-13).

Las elevadas tasas de exceso de peso y de sus complicaciones reportadas en comunidades indígenas estarían relacionadas con cambios en los estilos de vida, incluidos los hábitos alimentarios y reducción de la actividad física y eso explicaría la coexistencia de déficit de crecimiento y obesidad en estos niños indígenas (14,15). Algunos autores han señalado que se estaría frente al efecto compensatorio de desnutrición crónica, ocurrida en los primeros años de vida y conductas alimentarias que inducen al sobrepeso y aumento del sedentarismo (16).

La mayoría de los indígenas chilenos corresponde a los llamados mapuche o araucanos, que habitan en la región centro sur del país. Según el último censo poblacional, cerca del 6% de la población chilena pertenece a esta etnia, y en su mayoría viven en zonas rurales, aunque cada vez se observa mayor presencia de estos grupos en los grandes centros urbanos (17). Cabe señalar también que este grupo poblacional ha mantenido una condición socioeconómica más desventajosa que la de sus pares no indígenas (18).

Con estos antecedentes, se realizó el presente estudio cuyo objetivo, fue establecer la asociación entre pertenecer a la etnia indígena y el estado nutricional (composición corporal), controlando por condiciones socioeconómicas familiares, en dos momentos del desarrollo puberal (telarquia y menarquia) en adolescentes indígenas y no indígenas que asistían al sistema público de educación en la región de la Araucanía, Chile.

## MATERIAL Y METODO

Corresponde a un estudio transversal que es la fase inicial de un seguimiento de cohortes de adolescentes para verificar su crecimiento físico y cambios en su estado nutricional. Para establecer la muestra se realizó un tamizaje del universo de alumnas matriculadas en 168 escuelas del servicio público de educación de la región de la Araucanía, entre los años 2006 - 2007.

Para identificar a los participantes del grupo de telarquia se realizó un tamizaje de 1879 adolescentes entre 7 a 13 años. Para reconocer la telarquia se realizó palpación del botón mamario, por dos enfermeras matronas, capacitadas y padronizadas por médico endocrinólogo, las que fueron permanentemente supervisadas. Se denominó mama con grado II de desarrollo a la presencia de aumento de volumen de la glándula mamaria de 1 a 2 cm, de consistencia mayor que el tejido adyacente, generalmente dolorosa al tacto (19). Esta clasificación se acompañó de la identificación del grado de desarrollo por las propias adolescentes, a través de fotos, siendo priorizada la clasificación realizada por las profesionales de salud. Este grupo quedó constituido por 230 adolescentes, 112 de origen indígena y 118 no indígenas.

Para establecer el grupo de menarquia se tamizaron

adolescentes entre 9 y 16 años matriculadas en las mismas escuelas que las niñas del grupo anterior, a las que se aplicó un cuestionario estructurado (n= 8.495 adolescentes) para verificar la fecha exacta de su primera menstruación y los apellidos de sus padres. Fueron excluidos 129 cuestionarios debido a respuestas incompletas en la composición de sus apellidos o fechas inexactas de sus menarquias. Las escolares que habían tenido su menarquia hasta 2 meses antes de la fecha de aplicación del cuestionario fueron convidadas a participar en el estudio. De este grupo, de 239 adolescentes; 113 indígenas y 126 no indígenas ingresaron al estudio.

Para la identificación de la etnia se consideraron los apellidos de cada progenitor, clasificándose como de procedencia indígena aquellas escolares que tenían sus apellidos y los de sus padres de este origen, y como no indígenas las que tenían sus 4 apellidos de origen chileno-español, para aquello se recurrió a una base de apellidos de procedencia indígena que fueron validados por lingüistas de la lengua mapuche (20).

Para ingresar al estudio se excluyeron las adolescentes que padecían de alguna enfermedad crónica, genética o metabólica y las con mezcla de apellidos y/o aquellas en que se desconocían los apellidos de alguno de los progenitores.

Las evaluaciones antropométricas las realizaron enfermeras matronas previamente capacitadas y padronizadas según normas internacionales para control de calidad de la información recolectada (21) y los instrumentos fueron constantemente calibrados. El peso se midió en una balanza automática, marca seca, con precisión de 100 gramos, la estatura con un antropómetro con precisión de 1 milímetro. Las mediciones se realizaron con ropa liviana y sin zapatos.

La circunferencia del brazo y de la cintura se midieron con una cinta métrica flexible, en el punto medio del brazo no dominante la primera (entre el acromion y el olecranon) y en el punto medio entre la última costilla y la cresta iliaca la segunda, medición alineada al plano horizontal. Los pliegues cutáneos: tricaptal (PT) y subescapular (PSE) se midieron con un calíper modelo Harpenden con precisión de 0,2 mm. El PT se midió en el punto medio de la parte posterior del brazo, en la región del tríceps, y el PSE se obtuvo bajo el ángulo de la escápula.

Las variables socioeconómicas fueron recolectadas en un cuestionario validado aplicado a los padres de las adolescentes el que recogió información sobre bienes de uso doméstico y años de educación de los progenitores variables destinadas a construir un índice socioeconómico de amplio uso en el país, para caracterizar grupos sociales (22).

Las comparaciones entre los grupos étnicos se hicieron a partir de parámetros de tendencia central. La medición de la significancia estadística de promedios, se realizó a través de análisis de varianza y se elaboraron modelos de regresión lineal para verificar la asociación de la etnia con las variables

de composición corporal controlando el efecto de confusión e interacción entre las variables, considerando significativos valores de  $p$  inferiores a 0,05 y/o intervalos de confianza de 95%. Para controlar el efecto de las variables socioeconómicas se construyó un índice que analizó en conjunto variables estructurales del hogar, educación de los padres y datos coyunturales (bienes de uso domésticos).

El índice de masa corporal (IMC) de las adolescentes se analizó en puntajes  $z$  según referencia internacional sugerida por el CDC/NCHS (23). La evaluación de la masa magra se realizó a través del cálculo del área muscular del brazo, corregida según sexo y edad (AMBc) propuesto por Frisancho (24). La masa grasa (MG) fue analizada por medio de la ecuación propuesta por Slaughter y colaboradores para niñas y adolescentes (cuya fórmula utiliza los pliegues cutáneos tricaptal y subescapular) (25) y a través de la circunferencia de cintura (CC). Las variables se trabajaron en forma continua.

La digitación de los datos se realizó en el programa EPI Data versión 2.1, efectuándose doble digitación. El procesamiento de la información se hizo utilizando el paquete

estadístico SPSS versión 15.0

Este proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Al inicio de la investigación se solicitó un asentimiento por parte de las escolares y también la firma de un consentimiento informado de los padres.

## RESULTADOS

La edad de la telarquia ocurrió a los 123,5 meses, equivalentes a 10 años y tres meses, sin diferencias significativas entre las etnias. La menarquia ocurrió 2 años después, algo más temprano en las adolescentes no indígenas ( $P=0,006$ ). Las madres de las niñas indígenas en etapa de telarquia han cursado 2,4 años menos que las de las madres no indígenas ( $p<0,001$ ), tendencia que se mantiene en la menarquia, aumentando la diferencia a 3,2 años, el número de bienes doméstico fue casi el doble en las familias de las niñas no indígenas, como se observa en la Tabla 1.

TABLA 1  
Características de adolescentes indígenas y no indígenas en el momento de la telarquia y menarquia

Características	Adolescentes en etapa de telarquia		p	Adolescentes en etapa de menarquia		P
	No indígenas (N= 118)	Indígenas (N=112)		No indígenas (N= 126)	Indígenas (N= 113)	
Edad (meses)	123,0±10,9	124,1±12,6	0,490	149,0±11,8	153,2±11,0	0,006
Escolaridad de la madre	9,2±3,6	6,8±3,0	0,0001	9,4±3,1	6,2±3,2	0,0001
Número de bienes en el hogar	4,6±1,6	2,5±1,8	0,0001	4,8±1,8	2,3±1,7	0,0001

DE: desviación estándar

El promedio de peso de las escolares indígenas en telarquia fue 1,6 kg mayor que el de las no indígenas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,029$ ). El IMC en puntajes  $z$ , la circunferencia de cintura y la masa magra fueron significativamente mayores en las indígenas al momento de la telarquia, y fueron mayores en la menarquia, pero las diferencias entre etnias disminuyeron alcanzando las indígenas valores significativamente más altos sólo para el puntaje  $z$  del IMC ( $p=0,044$ ) y la masa grasa ( $p=0,024$ ). Estos valores reflejan que la población estudiada tiene exceso de peso (Tabla 2).

En el análisis multivariado en que se analizaron las variables de composición corporal controladas por el índice socioeconómico se observó que pertenecer a la etnia mapuche aumentó el IMC en 0,37 puntajes  $z$  en la telarquia y en 0,44 en la menarquia ( $p<0,001$ ). La circunferencia de cintura se modificó significativamente por la etnia tanto en la telarquia como en la menarquia, el ser mapuche la aumenta en 3,3 cm en la telarquia y 3,17 en la menarquia ( $p<0,01$ ). Sólo en la menarquia la masa grasa aumentó significativamente al pertenecer a la etnia mapuche, mientras que la masa magra se modifica por esta característica (la etnia) en la telarquia (Tabla 3).

TABLA 2  
Características antropométricas de adolescentes indígenas y no indígenas en la telarquía y menarquía

Antropometría	Grupo telarquía		p	Grupo menarquía		p
	No indígenas (N= 118)	Indígenas (N=112)		No indígenas (N= 126)	Indígenas (N= 113)	
	X (IC)	X (IC)		X (IC)	X (IC)	
Peso (kg)	34,8	36,4 (33,8–35,4)	0,029 (35,8–37,4)	50,8 (48,9–52,7)	51,7 (50,2–53,6)	0,475
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18,1	19,3 (17,7-18,5)	0,004 (19,0-19,7)	21,7 (21,0-22,2)	22,8 (22,4-23,4)	0,037
IMC (puntaje z)	0,4	0,8 (0,26-0,56)	0,001 (0,62-0,90)	1,0 (0,81-1,15)	1,2 (1,17-1,40)	0,044
CC (cm)	62,9	66,7 (61,9-63,9)	0,000 (66,5-67,9)	72,5 (70,9-73,0)	74,6 (73,1-76,0)	0,053
MG (%)	19,3	20,4 (18,5-20,0)	0,130 (19,5-21,2)	23,0 (22,1-23,6)	24,4 (23,8-25,2)	0,024
MM (%)	17,5	18,4 (16,8-18,1)	0,047 (18,2-19,3)	25,5 (24,3-26,7)	25,4 (24,5-26,3)	0,740

95% IC: Intervalo de confianza

TABLA 3  
Asociación entre IMC y variables que miden composición corporal y pertenecen a la etnia indígena.

Grupo telarquía (N=230)		Grupo menarquía (N= 239)	
Variable	Ser indígena	Variable	Ser indígena
IMC(puntaje z)		IMC(puntaje z)	
Beta	0,37	Beta	0,44
IC (95%)	0,17 – 0,58	IC (95%)	0,18 – 0,70
P	0,0001	P	0,001
CC (cm.)		CC (cm.)	
Beta	3,33	Beta	3,17
IC (95%)	1,67 – 4,99	IC (95%)	0,73 – 5,60
P	0,0001	P	0,011
MG (%)		MG (%)	
Beta	0,97	Beta	2,40
IC (95%)	-0,23 – 2,16	IC (95%)	1,02 – 3,77
P	0,111	P	0,001
MM (%)		MM (%)	
Beta	1,27	Beta	1,46
IC (95%)	0,11 – 2,43	IC (95%)	-0,69 – 3,61
P	0,033	P	0,183

Ajustado por índice de nivel socio económico.

## DISCUSION

En este estudio realizado en cuatro grupos de adolescentes indígenas y no indígenas se comprobó que las indígenas al momento de la telarquía tienen un significativo mayor índice de masa corporal (expresado en medidas estandarizadas) mayor circunferencia de cintura y masa magra que las no

indígenas. Estos mayores valores en las indígenas se mantienen en la menarquía para el IMC, la circunferencia de cintura y masa grasa.

El hecho que se haya comprobado- en este estudio- un aumento de la masa grasa y magra entre la telarquía y menarquía corresponde a lo esperado para el sexo femenino (26), sin embargo que la masa grasa en la menarquía sea significativamente mayor en las adolescentes indígenas es una alerta, para fomentar en esta población hábitos alimentarios saludables y el desarrollo de una adecuada actividad física.

Este es uno de los pocos trabajos que han analizado la composición corporal de uno de los grupos indígenas del continente y confirma que la transición nutricional que pasan los países de la región (27,28) no está al margen de los indígenas que habitan en América Latina lo que debe constituir una alerta, porque estos grupos han ido adquiriendo hábitos y costumbres de la población no indígena, en lo que se ha llamado la “occidentalización” de estos pueblos (29,30). La adquisición de estos nuevos hábitos son difíciles de evitar ante la agresiva propaganda de productos industrializados a los que los indígenas tienen cada vez mayor acceso. Para mantener hábitos autóctonos y saludables de los pueblos originarios se deben buscar mecanismos que apoyen la producción de estos productos y estimular su consumo. Algunos investigadores, en el continente han verificado que esto último es posible (31).

La existencia de instituciones destinadas a cuidar y proteger a los pueblos originarios deben no sólo proteger el patrimonio de estos grupos, sino también deben estimular programas que fomenten la nutrición saludable y la actividad física suficiente con la finalidad de que las nuevas generaciones

desarrollen todo su potencial de crecimiento pero también que eviten el aumento de enfermedades crónicas, con hábitos, conductas y creencias inadecuadas.

El hecho que después de considerar el efecto de las variables socio económicas las niñas indígenas presentan mayores valores en los indicadores que evaluaron la composición corporal, se puede atribuir a que los nuevos estilos de vida han repercutido con mayor fuerza en este grupo poblacional, aunque no se puede descartar en ellas una mayor predisposición a tener elevados valores en los índices de composición corporal.

Afortunadamente algunos grupos indígenas del continente se han incorporado al desarrollo socioeconómico mejorando sus condiciones sociales como parece ser el caso de los mapuche en Chile y probablemente el de otros indígenas de América Latina, sin embargo desde el punto de vista de las políticas y programas se hace necesario estar alerta para que estos pueblos originarios no enfrenten un aumento en la incidencia de obesidad y de enfermedades crónicas, como la comunicada en los indígenas PIMA en EEUU (32).

Entre las complejidades de este estudio, está la dificultad de verificar el grado II de Tanner en adolescentes obesas, incluso utilizando el método de la palpación con profesionales capacitadas y con experiencia en este tipo de examen y entre las debilidades, está el que la composición corporal se determinó a través de mediciones antropométricas que no son las más precisas para su evaluación, a pesar que algunos estudios poblacionales las sugieren como un alternativa válida (33). Entre las fortalezas, se puede mencionar el rigor de la clasificación de la etnia indígena a través de marcadores como el de los apellidos que se han utilizado, últimamente como identificador de este origen étnico (34). A su vez, debe mencionarse que la muestra utilizada representa el universo de los adolescentes de toda una región del país que estaban en periodo de telarquía o que habían tenido recientemente su menarquía.

El que se haya detectado un aumento de los valores antropométricos entre telarquía y menarquía, es esperable, sin embargo es también una alerta, ya que es probable que el aumento del IMC y la masa grasa -en la maduración sexual- puede ser un factor de riesgo para el exceso de peso en la etapa adulta, especialmente en la mujer de ascendencia indígena. Este hecho sugiere que los sistemas de vigilancia nutricional incorporen indicadores que detecten oportunamente el aumento excesivo del índice de masa corporal y del porcentaje de masa grasa. Así también esta evidencia aconseja la ejecución de intervenciones preventivas para evitar enfermedades crónicas en la vida adulta.

## REFERENCIAS

1. Siervogel, R.M., E.W. Demerath, C. Schubert, K.E. Remsberg, W.C. Chumlea, S. Sun, S.A. Czerwinski, and B. Towne, Puberty and body composition. *Horm Res*, 2003;60(1):36-45.
2. Holst, D. and P.A. Grimaldi, New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 2002;13(3):241-5.
3. He, Q. and J. Karlberg, Bmi in childhood and its association with height gain, timing of puberty, and final height. *Pediatr Res*, 2001;49(2):244-51.
4. Ibanez, L., K. Ong, F. de Zegher, M.V. Marcos, L. del Rio, and D.B. Dunger, Fat distribution in non-obese girls with and without precocious pubarche: central adiposity related to insulinaemia and androgenaemia from prepuberty to postmenarche. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003;58(3):372-9.
5. Story, M., J. Stevens, J. Himes, E. Stone, B.H. Rock, B. Ethelbah, and S. Davis, Obesity in American-Indian children: prevalence, consequences, and prevention. *Prev Med*, 2003; 37(6 Pt 2): p. S3-12.
6. Remsberg, K.E., E.W. Demerath, C.M. Schubert, W.C. Chumlea, S.S. Sun, and R.M. Siervogel, Early menarche and the development of cardiovascular disease risk factors in adolescent girls: the Fels Longitudinal Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005;90(5):2718-24.
7. Sampei, M.A., E.N. Cano, U. Fagundes, E.E. Lima, D. Rodrigues, D.M. Sigulem, and R.G. Baruzzi, [Anthropometric assessment of Kamayura adolescents in the Upper Xingu, Central Brazil (2000-2001)]. *Cad Saude Publica*, 2007;23(6):1443-53.
8. Santos, R.V., [Physical growth and nutritional status of Brazilian indian populations]. *Cad Saude Publica*, 1993;9(1):46-57.
9. Lohman, T.G., B. Caballero, J.H. Himes, S. Hunsberger, R. Reid, D. Stewart, and B. Skipper, Body composition assessment in American Indian children. *Am J Clin Nutr*, 1999;69(4): 764S-766S.
10. Bustos, P., H. Amigo, S.R. Munoz, and R. Martorell, Growth in indigenous and nonindigenous Chilean schoolchildren from 3 poverty strata. *Am J Public Health*, 2001;91(10):1645-9.
11. Caballero, B., J.H. Himes, T. Lohman, S.M. Davis, J. Stevens, M. Evans, S. Going, and J. Pablo, Body composition and overweight prevalence in 1704 schoolchildren from 7 American Indian communities. *Am J Clin Nutr*, 2003;78(2):308-12.
12. Jimenez-Cruz, A., M. Bacardi-Gascon, and A.A. Spindler, Obesity and hunger among Mexican-Indian migrant children on the US-Mexico border. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003; 27(6):740-7.
13. Monarrez-Espino, J., H. Martinez, V. Martinez, and T. Greiner, Nutritional status of indigenous children at boarding schools in northern Mexico. *Eur J Clin Nutr*, 2004;58(3): 532-40.
14. Ravussin, E., M.E. Valencia, J. Esparza, P.H. Bennett, and L.O. Schulz, Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care*, 1994;17(9):1067-74.
15. Tavares, E.F., J.P. Vieira-Filho, A. Andriolo, A. Sanudo, S.G. Gimeno, and L.J. Franco, Metabolic profile and cardiovascular risk patterns of an Indian tribe living in the Amazon Region of Brazil. *Hum Biol*, 2003;75(1):31-46.

16. Amigo, H., P. Bustos, M. Erazo, and M.E. Radrigan, [Nutritional status of school children from indigenous and non indigenous ancestry]. *Rev Med Chil*, 1999;127(8):903-10.
17. Instituto Nacional Estadística. Censos de Población y Vivienda. Censo 2002. Principales resultados XVII Censo Nacional de Población y VI de Vivienda. 2002 [cited 20/05/2009]; Available from: [www.ine.cl](http://www.ine.cl).
18. Ministerio Planificación Nacional. Encuestas CASEN 2006. Modulo de Pobreza. 2006 22 de Mayo 2009 [cited 22 Mayo 2009 ]; Available from: [www.mideplan.cl](http://www.mideplan.cl).
19. Tanner, J., Growth at adolescence Second Edition ed. 1962, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
20. Amigo, H. and P. Bustos, Apellidos Mapuche Historia y Significado. 2008, Santiago Impresos Maigret Ltda. 124.
21. de Onis, M., A.W. Onyango, J. Van den Broeck, W.C. Chumlea, and R. Martorell, Measurement and standardization protocols for anthropometry used in the construction of a new international growth reference. *Food Nutr Bull*, 2004;25(Suppl 1):S27-36.
22. ADIMARK. Mapa socioeconómico de Chile. 2004 [cited 15/05/2009]; Available from: [www.adimark.cl/medios/estudios/Mapa\\_Socioeconomico\\_de\\_Chile.pdf](http://www.adimark.cl/medios/estudios/Mapa_Socioeconomico_de_Chile.pdf).
23. Mc Dowell M, F.C., Ogden C, Flegal K. , Anthropometric reference data for children and adults: United States , 2003-2006. *National Health Statistics Report* 2008;10:1-48.
24. Frisancho, A.R. and D.P. Tracer, Standards of arm muscle by stature for the assessment of nutritional status of children. *Am J Phys Anthropol*, 1987;73(4):459-65.
25. Slaughter, M.H., T.G. Lohman, R.A. Boileau, C.A. Horswill, R.J. Stillman, M.D. Van Loan, and D.A. Bembien, Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol*, 1988;60(5):709-23.
26. Rosso, P., Aspectos biológicos del desarrollo in *Pediatría J. Meneghello, et al., Editors. 1997, Editorial Medica Panamericana: Buenos Aires. p. 65-78.*
27. Uauy, R., C. Albala, and J. Kain, Obesity trends in Latin America: transiting from under- to overweight. *J Nutr*, 2001; 131(3):893S-899S.
28. Barria, R.M. and H. Amigo, [Nutrition transition: a review of Latin American profile]. *Arch Latinoam Nutr*, 2006;56(1):3-11.
29. Garcia, V. and P. Bustos, Alimentación durante el primer año de vida y al ingreso a la escuela in Niños Mapuche: Crecimiento, Nutrición y Salud, H. Amigo, P. Bustos, and M. Erazo, Editors. 2001, Imprenta Maigret: Santiago.59-69.
30. Story, M., M. Evans, R.R. Fabsitz, T.E. Clay, B. Holy Rock, and B. Broussard, The epidemic of obesity in American Indian communities and the need for childhood obesity-prevention programs. *Am J Clin Nutr*, 1999; 69(Suppl 4): 747S-754S.
31. Soares, M., Consumo alimentar, in Transformação e persistência: antropologia da alimentação e nutrição em uma sociedade indígena amazônica. 2007, Editora Fiocruz: Rio de Janeiro. p. 123-161.
32. Krosnick, A., The diabetes and obesity epidemic among the Pima Indians. *N J Med*, 2000;97(8):31-7.
33. Hammond, J., R.J. Rona, and S. Chinn, Estimation in community surveys of total body fat of children using bioelectrical impedance or skinfold thickness measurements. *Eur J Clin Nutr*, 1994;48(3):164-71.
34. Rojas, F., Poverty determinants of acute respiratory infections among Mapuche indigenous peoples in Chile's Ninth Region of Araucania, using GIS and spatial statistics to identify health disparities. *Int J Health Geogr*, 2007;6:26.

Recibido: 14-03-2009

Aceptado: 28-05-2009

## Estado nutricional de vitamina A en preescolares con padecimientos oculares

*Emma T. Villaseñor-Fierro, Edgar Vásquez-Garibay, Enrique Romero-Velarde, Miguel Kumazawa-Ichikawa, Salvador Villalpando-Hernández, Ezequiel Vélez-Gómez*

Instituto de Nutrición Humana, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Hospital Civil de Guadalajara, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México

**RESUMEN.** El propósito del estudio fue evaluar el estado nutricional de vitamina A en preescolares con padecimientos oculares que acuden al Hospital Civil de Guadalajara. En estudio transversal analítico se incluyeron por conveniencia 100 sujetos (24-71 meses) con padecimiento ocular. El consumo de vitamina A (VA), energía y macro nutrientes se estimó con una encuesta dietética de recordatorio de 24 horas (EDR-24h). Mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se determinó la concentración sérica de retinol y se realizó una citología de impresión conjuntival (CIC) por un patólogo entrenado en la técnica. Se estimaron los índices talla/edad y peso/talla (Puntaje z) y se utilizaron las pruebas de ANOVA, U de Mann Whitney y de correlación de Spearman. Fueron niñas 44,1% y varones 55,9%. Los padecimientos oculares más frecuentes fueron: estrabismo (41,9%), conjuntivitis (19,4%) y padecimientos congénitos (17,2%). Según la EDR-24 h el consumo de vitamina A fue de 374 µg/día ± 706; la concentración de Retinol sérico 30 µg/dL ± 7,6 y CIC fue normal en 75,6%. Sólo 3,2% a 3,5% presentaron deficiencia de VA (concentración de retinol y CIC). No hubo asociación entre padecimientos oculares y deficiencia de VA. Hubo correlación positiva entre consumo de vitamina A e índice peso/talla ( $r = 0,244$ ). En conclusión, la mayoría de los preescolares cubrió la ingestión recomendada de vitamina A, la deficiencia de esta vitamina fue baja y no se asoció a padecimientos oculares.

**Palabras clave:** Deficiencia de vitamina A, preescolares, padecimiento ocular.

### INTRODUCCION

La vitamina A es necesaria para el crecimiento y la diferenciación celular, es un componente indispensable del pigmento de los foto-receptores visuales y su carencia afecta la integridad de las células conjuntivales, resultando en queratinización de tejidos, incluyendo el cristalino (1), destrucción de la córnea (queratomalacia), hemeralopía (2) y ceguera (3). La deficiencia de vitamina A (DVA) es causa de ceguera en alrededor de 10% del total de los niños ciegos en el mundo y cerca de 8,2 millones de los casos de DVA ocurren en América Latina (4). En México, en una revisión realizada en la década de los años 90's (5) se observó que la ingestión de vitamina A en zonas rurales del país cubría sólo 60% a 80% de las ingestiones dietéticas recomendadas y alrededor

**SUMMARY. Nutritional status of vitamin A in preschoolers with ocular diseases.** The purpose was to evaluate the nutritional status of vitamin A in preschool children with ocular diseases attending to the Hospital Civil of Guadalajara. In a cross sectional design 100 preschool children between 24 and 71 mo of age with ocular diseases were included. Vitamin A intake was evaluated by 24 h dietetic recall, plasma Retinol concentration by high pressure liquid chromatography (HPLC); and conjunctiva impression cytology (CIC) was carried out by a trained pathologist. ANOVA and U Mann Whitney tests, and also Spearman correlations were estimated. There were 44.1% females and 55,9% males. Strabismus was the most common disease (41,9%), conjunctivitis (19,4%), and congenital diseases (17,2%). The mean intake of Vitamin A was 374 µg/d ± 706 and the serum concentration of retinol was of 30 µg/dL ± 7,6; CIC was normal in 75,6%. The percentage of vitamin A deficiency was 3,2% according to the serum concentration of Retinol and 3,5% to the CIC criteria. It was not association between the nutritional status of vitamin A and ocular diseases. A positive correlation between vitamin A intake and weight/height index ( $r = 0,244$ ) was found. In conclusion, most preschool children covered the dietary reference intake recommendation of vitamin A; deficiency of this vitamin was lower and, it was not associated to ocular diseases.

**Key words:** Vitamin A deficiency, preschool children, ocular disease.

de 10% presentaban manifestaciones clínicas de deficiencia. Más adelante, la Encuesta Nacional de Nutrición de 1999 (6) mostró una prevalencia de DVA de 25 a 30% utilizando la concentración de retinol en plasma. En la Región Centro del país, se observaron concentraciones bajas de retinol (10-20 µg/dL) en 28% de niños de cinco a seis años y 34,2% en niños de tres a cuatro años, sin embargo, la concentración de retinol < 10 µg/dL sólo ocurrió en 3,9% de estos niños. Generalmente, la forma sub-clínica de DVA se observa con concentraciones de retinol sérico de 10-20 µg/dL y la forma clínica (daño ocular) cuando ésta es < 10 µg/dL. Los cambios oculares por deficiencia grave de vitamina A son conocidos, aunque, la información en deficiencia moderada es insuficiente y en ocasiones contradictoria (7-9), a pesar de que sería muy necesaria e importante en la planeación de la

suplementación con vitamina A (10, 11).

Por tanto, el propósito de este reporte es informar sobre el estado nutricional de vitamina A en preescolares con padecimientos oculares, con el uso de tres indicadores: ingestión de Vitamina A, concentración plasmática de Retinol y citología de impresión conjuntival (CIC).

## MATERIAL Y METODOS

En un estudio transversal analítico y un muestreo aleatorio simple, se incluyeron 100 preescolares de uno u otro sexo, de 24 a 71 meses de edad que acudieron por un padecimiento ocular por primera vez a la consulta oftalmológica del OPD Hospital Civil de Guadalajara entre marzo a junio del 2005. La muestra se calculó con la siguiente fórmula:  $n = (Z1-\alpha/2 + Z1-\beta)^2 [P(1-P)] / \delta^2$  (12). Donde:  $\alpha = 0.05 = 1.96$ ,  $\beta = 0.20 = 0.84$ ;  $p = 35\%$  de prevalencia de deficiencia sub-clínica de vitamina A (4, 13),  $\delta = (0.42 - 0.28)^2$ , límite superior e inferior de la prevalencia aceptada (20%);  $n = 90$ .

### Variables

#### Dependiente: Padecimientos oculares

Independiente: Estado nutricional de vitamina A evaluado por: encuesta dietética por recordatorio de 24 h, concentración de retinol sérico ( $\mu\text{g/dL}$ ) y CIC que valora la actividad celular del epitelio conjuntival. Otras variables incluidas: sexo, edad, procedencia, peso, talla, índices peso/talla, talla/edad, infección de vías respiratorias superiores (IVRS), episodios diarreicos, alergias no oculares, visión, agudeza visual, capacidad visual, ojo rojo, dolor, ardor y prurito ocular, lagrimeo, secreción conjuntival, nictalopía, aspecto del segmento anterior, fundoscopia, motilidad ocular y tiempo de evolución.

Estrategia de trabajo clínico. Se realizó una evaluación completa a cada niño que incluyó: ficha clínica, interrogatorio de antecedentes, motivo de consulta. Exploración oftalmológica: agudeza y/o capacidad visual, examen del segmento anterior, fundoscopia y motilidad ocular para confirmar algún diagnóstico de patología ocular.

Técnicas de medición. Cada niño fue pesado y medido siguiendo las técnicas antropométricas descritas (14). Los índices antropométricos talla/edad y peso/talla fueron estimados en puntaje Z de acuerdo a los criterios y referencia de la OMS (15). Por razones logísticas sólo fue aplicada una encuesta por recordatorio de 24 h fue realizada por una nutrióloga entrenada con el uso de réplicas de alimentos mediante una entrevista a la madre o persona responsable del niño, aunque reconocemos que a la fecha se sugiere que sea obtenidas cuando menos dos encuestas en días no consecutivos. Los datos obtenidos se analizaron en el paquete de "software" *Mexfoods*. (16). A las 08:00 h am, se obtuvieron muestras de sangre total por punción venosa en ayuno y después de un

proceso de centrifugación, las muestras fueron preparadas para dejar el suero en congelación; se colocaron en tubos ámbar con cuidados meticulosos en su manejo antes de la determinación de retinol. Al término del estudio las muestras fueron analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en el Instituto Nacional de Salud Pública. Se consideraron valores normales por arriba de 20  $\mu\text{g/dL}$ ; deficiencia subclínica 10 a 20  $\mu\text{g/dL}$  y deficiencia  $< 10 \mu\text{g/dL}$ . A cada ojo se le realizó una CIC conforme al manual de entrenamiento de Centro Internacional de Oftalmología Epidemiológica y Preventiva (ICEPO, por sus siglas en inglés) (17) y que consiste en hacer una identificación histológica de las células caliciformes. Criterio: Normal o Grado 0 numerosas células ( $200 \times \text{c/mm}^2$ ) y células epiteliales con bordes regulares; Marginal o grado 1: pocas células caliciformes ( $50-200 \times \text{c/mm}^2$ ), gotas de mucina y algunas células epiteliales con descamación; y grado 2 o anormal: mínimo de células caliciformes ( $< 50 \times \text{c/mm}^2$ ), células epiteliales con bordes irregulares y descamación.

Procesamiento de datos y análisis estadístico. La información se incluyó en una base de datos procesada en el programa SPSS versión 12 para Windows. Se utilizó ANOVA para el análisis de la concentración de retinol por padecimientos oculares y la prueba U de Mann Whitney para la comparación de los promedios de ingestión de vitamina A por grupos de padecimientos oculares. Además, se prefirió la prueba de correlación de Spearman para identificar la relación entre indicadores antropométricos (índice peso/talla) y vitamina A, consumo de energía y grasas.

Consideraciones éticas. Se obtuvo una hoja de consentimiento informado por escrito de acuerdo a la Ley General de Salud (1997) firmado por uno de los padres de cada sujeto incluido en el estudio. El trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca" y registrado con el número 511/05.

## RESULTADOS

De acuerdo al criterio previamente establecido, siete preescolares fueron excluidos por el antecedente confirmado por la madre de peso al nacer menor a 2500g. De los 93 casos restantes, 41 (44,1%) fueron niñas y 52 (55,9%) niños; 75 (81,5%) eran mayores de 36 meses de edad. La mayoría (57%) procedía de otros estados del país y del interior del estado de Jalisco y 43% vivían en la zona metropolitana de Guadalajara. Las IVRS fueron relativamente frecuentes (3-7 al año) en 26,9% de los casos y muy frecuentes ( $> 7$  al año) en 14%, (estas infecciones no estaban presentes al momento del estudio). Los episodios diarreicos fueron poco comunes en la mayoría de los sujetos (91,4%). El promedio de la puntuación Z en los índices antropométricos talla/edad y peso/talla fue superior a la mediana

de referencia (15), observándose escasa frecuencia de desnutrición. Con el índice peso/talla 15,1% de los preescolares se encontraron por arriba de +2 DE. Se observó una correlación positiva entre consumo de vitamina A y el índice Peso/Talla ( $r = 0,244$ ,  $p < 0.01$ ). Este hallazgo sugiere que los niños con mayor índice peso/talla (un porcentaje significativo presentó sobrepeso) tuvieron probablemente mayor consumo de vitamina A procedente de alimentos de origen animal. Este dato se refuerza por la gran correlación entre consumo de grasas y energía ( $r = 0,805$ ,  $p < 0.001$ )

En 20,4%, los niños no fueron aptos para colaborar en una agudeza visual por su corta edad. En los restantes, la agudeza visual del ojo derecho fue regular o mala en 23,5% de los casos y del ojo izquierdo en 20% de los casos. Uno de cada cinco niños presentó una agudeza visual de regular a mala de ambos ojos, 12% ya usaba lentes al llegar a la consulta y de este grupo, la corrección era de regular a mala en 21% de los casos en el ojo derecho y 55% en el ojo izquierdo. De los signos y síntomas oculares predominaron: alteración en la motilidad ocular (22,6%), hiperemia conjuntival (14%) y ardor (7,5%). La ceguera nocturna nictalopía, síntoma de deficiencia en vitamina A, sólo ocurrió en 2,2%. La evolución de los padecimientos oculares fue considerada aguda ( $< 1$  mes) en 11,8% de los casos y crónica ( $> 12$  meses) en 71% de los casos. La patología ocular más común fue el estrabismo (42%). Uno de cada cinco niños presentó conjuntivitis y los traumatismos fueron raros (3-4%). El promedio de ingestión de vitamina A por patologías tuvo amplias fluctuaciones entre 418 a 932  $\mu\text{g/d}$  sin diferencias significativas entre padecimientos y con amplias desviaciones estándar. Este hallazgo muy probablemente debido a la poca precisión en el uso de una sola encuesta dietética por recordatorio de 24 horas para esta vitamina. No hubo diferencias significativas en los promedios de ingestión de vitamina A y en las concentraciones de Retinol sérico entre los diferentes padecimientos oculares.

TABLA 1  
Padecimientos oculares<sup>1</sup> y concentración sérica de retinol

Padecimiento	Frecuencia		Retinol $\mu\text{g/dL}$	
	N	%	Promedio	DE
Estrabismo	39	41,9	30,4	6,8
Conjuntivitis	18	19,4	28,2	5,5
Congénitos	16	17,2	31,2	11,9
Ametropías	11	11,8	30,9	5,9
Patología palpebral	5	5,4	29,1	8,7
Traumatismos	4	4,3	27	3,6
Total	93	100	30	7,5

<sup>1</sup>Diferencias no significativas entre concentraciones séricas de retinol por padecimientos (ANOVA)

En 50% de los sujetos hubo una ingestión baja de vitamina A; según la concentración sérica de retinol hubo deficiencia sub-clínica en tres casos (3,2%) y con la evaluación de la CIC se consideró una deficiencia sub-clínica (estado celular de las conjuntivas anormal) en 3,5% de los casos.

TABLA 2  
Estado nutricional de vitamina A en preescolares con padecimientos oculares

Indicador	N	%
Ingestión de Vitamina A ( $\mu\text{g/d}$ ) <sup>1</sup>		
Alto	20	21,5
Adecuado	23	24,7
Bajo	50	53,6
Total	93	99,8
Retinol Sérico ( $\mu\text{g/dL}$ )		
Adecuado	90	96,8
Depleción/deficiencia ( $< 20 \mu\text{g/dL}$ )	3	3,2
Total	93	100
Citología de Impresión Conjuntival		
Normal	65	75,6
Marginal	18	20,9
Anormal	3	3,5
Subtotal	86	100
Inflamación	1	1,1
Muestra insuficiente	4	4,3
Sin muestra	2	2
Total	93	99,9

<sup>1</sup> 24 a 36 meses: 300  $\mu\text{g/d}$ , 37 a 71 meses: 400  $\mu\text{g/d}$ . Recomendación diaria: Adecuada: 90-110%; Baja  $< 90\%$ ; Alta:  $> 110\%$  (25)

La ingestión de energía fue discretamente baja (1250 kcal/d) y cubría 89,2% de la ingestión recomendada (18). Del total de la ingestión de energía, las grasas contribuyeron con 23,7% y los hidratos de carbono con 62,2%.

## DISCUSION

Consideramos que el uso de tres indicadores distintos para evaluar el estado nutricional de vitamina A dio mayor confiabilidad a los resultados, especialmente los indicadores directos: Concentración sérica de retinol y CIC. Es conocido que la encuesta dietética por recordatorio de 24 h es un indicador indirecto y es más confiable cuando se realiza en tres días diferentes, sin embargo, esta práctica se complica en niños que asisten a la consulta externa en hospitales para población abierta debido a que proceden de familias de condiciones socioeconómicas pobres.

Hubo un mayor porcentaje de niños que niñas (11,8% más), situación sin una explicación lógica ya que no se ha reportado que la prevalencia de padecimientos oculares sea

mayor en varones. Es posible, como se ha especulado antes, que las madres privilegien a los hijos vs. las hijas cuando hay necesidad de acudir al médico y/o equipo de salud (19-21). El porcentaje de niños de 24 a 36 meses fue significativamente menor que el de niños de 37 a 71 meses (18,5 vs. 81,5% respectivamente). Es probable que esta desproporción se deba más a que los padres acuden tardíamente a la consulta oftalmológica de su hijo preescolar y menos a que los padecimientos oculares sean más frecuentes en los preescolares de mayor edad.

Alrededor de 13% de los niños se encontraron por debajo de  $-1$  DE en los índices peso/talla y talla/edad, pero solo 3-4% estuvieron debajo de  $-2$  DE; hallazgos que serían observados en una población pediátrica sana de distribución normal. Con el índice peso/talla 15% de los niños se ubicaron arriba de  $+2$  DE (15). Este hallazgo confirmaría que en esta población, teóricamente más vulnerable a la desnutrición por pertenecer a estratos bajos y medio-bajos, coexisten la desnutrición y el sobrepeso desde edades tempranas de la vida como parte del fenómeno de la transición nutricia que existe en México y otros países emergentes (22).

Fue relevante la ausencia de una asociación entre deficiencia de vitamina A y/o datos clínicos de deficiencia de este nutrimento en los preescolares con padecimientos oculares, a pesar del uso de un mínimo de dos parámetros biológicos: concentración de retinol sérico y CIC para determinar el estado nutricional de vitamina A como se ha sugerido por otros autores (23). Es necesario enfatizar que la encuesta por recordatorio de 24 h realizada en una sola ocasión mostró una gran variabilidad. En consecuencia, este indicador indirecto no es útil para evaluar el estado nutricional de vitamina A dado que el consumo día-día de vitamina A varía significativamente y por tanto se requerirían cuando menos tres encuestas para estimar su verdadero consumo.

Desde la década de años 60's se ha reconocido la presencia de DVA sub-clínica (retinol sérico  $< 20$   $\mu\text{g/dL}$ ) en América Latina y el Caribe. En menores de cinco años de edad la prevalencia oscila entre 6% en Panamá a 36% en El Salvador, mientras que en Cuba, es prácticamente inexistente (24, 25). Por otra parte, hace poco más de una década se encontró una prevalencia de deficiencia de retinol relativamente elevada en la zona rural de México (29%), porcentaje similar al referido en otras poblaciones de América Latina, pero muy diferente a la prevalencia (5%) observada en zona urbana (26). La prevalencia de DVA encontrada en los preescolares con padecimientos oculares estudiados coincidirían más con esa prevalencia urbana y menos con la ENN-99 (6) según la cual 23% de la población rural y 35% de la urbana tendrían depleción de vitamina A (10-20  $\mu\text{g/dL}$ ). En el presente estudio solo 3,2% de los casos presentó concentraciones séricas de retinol sugestivas de depleción y no hubo casos de deficiencia

( $< 10$   $\mu\text{g/dL}$ ). Esta baja prevalencia coincidió con los resultados de la CIC. En 75,6% de los casos la CIC fue normal, con datos marginales en 20,9% y anormales en 3,5%, aunque los tres casos de CIC anormal, no correspondieron a los niveles más bajos ( $< 20$   $\mu\text{g/dL}$ ) de retinol sérico.

Un hallazgo de apariencia paradójico, fue que la mayor concentración de retinol sérico se asoció significativamente a la presencia de episodios diarreicos ( $p = 0,04$ ). Este hallazgo coincidiría con un estudio aleatorio, doble ciego realizado en el área peri urbana de la Ciudad de México en 736 niños (6-15 meses) donde encontraron que la suplementación con vitamina A se asoció a un incremento de la enfermedad diarreica (RR 1,27) y observaron la paradoja de que la suplementación con vitamina A disminuye los episodios diarreicos en niños de hogares sucios y los incrementa en hogares limpios con baño y agua intra-domiciliaria (27)

En conclusión, los hallazgos sugieren que: 1) La deficiencia y/o depleción de vitamina A no acompañan necesariamente a los padecimientos oculares en preescolares que acuden al hospital; 2) Hubo coincidencia en la prevalencia de deficiencia de vitamina A entre los hallazgos en la CIC anormal en 3,5% de los casos y la prevalencia de depleción y/o deficiencia de vitamina A determinada por la concentración de retinol sérico ( $< 20\mu\text{g/dL}$ ) en 3,2%; y 3) Que el método directo de valoración de la citología de impresión conjuntival podría ser un indicador útil y práctico del estado nutricional de vitamina A cuando se carezca, como sucede en la mayoría de los hospitales del país, del recurso de determinar la concentración de retinol en suero.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las siguientes personas que trabajaron desinteresadamente en la realización del presente estudio: Lic. N. Nayelly V. Espinosa Jaime, Lic. N. Mariana A. García García, Enf. Ma. Elena Manzo Chávez, Quim. Norma Zambrano Mújica, Tec. Lab. Patricia Ramírez Martínez.

## REFERENCIAS

1. Craft EN. Innovative Approaches to Vitamin A Assessment. *J Nutr.* 2001; 131:1626S-30S.
2. Polizzi A, Schenone M, Sacca SC, Burlando S, Freedman D, Marinari G et al Hipovitaminosis A. *Br J Ophthalmol.* 1998; 82: 303-05 .
3. Sommer A. Vitamin A deficiency and childhood mortality. Conference "Ending Hidden Hunger", Bellagio, Italy. *Lancet* 1992; 339: 864
4. Castejón HV, Ortega P, Díaz ME, Amaya D, Gómez G, Ramos M et al. Prevalencia de deficiencia sub-clínica de vitamina A y desnutrición en niños marginales de Maracaibo-Venezuela. *Arch Latinoam Nutr.* 2001; 51: 25-32.

5. Rosado JL, Bourges H, Saint-Martín B. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: II. Deficiencia de vitaminas. *Salud Pública Mex.* 1995; 37: 452-61
6. Rivera – Dommarco J, Shamah- Levy T, Villalpando- Hernández S, Gonzalez de Cossío, Hernández Prado B, Sepúlveda J. Encuesta Nacional 1999. Edo. Nutricio de niños y mujeres en México Cuernavaca Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Publica, 2001.
7. Gupta M, Gupta BP, Chauhan A, Bhardwaj A. Ocular morbidity prevalence among school children in Shimia, Himachal, North India. *Indian J Ophthalmol* 2009; 57(2):133-38.
8. Sitorus RS, Abidin MS, Prihartono J. causes and temporal trends of childhood blindness in Indonesia: study at schools for the blind in Java. *Br J Ophthalmol* 2007; 91(9): 1109-13.
9. Titiyal JS, Pal N, Murthy GV, Gupta SK, Tandon R, Vajpayee RB, Gilbert CE. Causes and temporal trends on blindness and severe visual impairment in children in schools for the blind in North India. *Br J Ophthalmol* 2003; 87(8): 941-45.
10. Underwood BA. Vitamin A deficiency disorders: international efforts to control a preventable “pox”. *J Nutr* 2004; 134(1): 231S-236S.
11. Chen H, Zhuo Q, Yuan W, Wang J, Wu T. Vitamin A for preventing acute lower respiratory tract infections in children up to seven years of age. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; 23: CD006090
12. Albert PS, Borkowf GB. Principles and practice of clinical research. San Diego, Ca: Academic Press 2002; p. 179-85
13. Páez MC, Solano L, Del Real S. Indicadores de riesgo para la deficiencia de vitamina A en menores de 15 años de una comunidad marginal de Valencia, Venezuela. *Arch Latinoam Nutr* 2002; 52(1): 12-19
14. Vásquez-Garibay EM, Romero-Velarde E. Valoración del estado nutricional. Nutrición de lactante y preescolar en la salud y enfermedad. PAC Pediatría. Tomo 1. México DF: Intersistemas SA de CV 2004: p. 39-50
15. World Health Organization. Measuring change in nutritional status: guidelines for assessing the nutritional impact of supplementary feeding programmes for vulnerable groups. Geneva: WHO, 1983; p.29.
16. Muñoz de Chávez M, Roldán JA, Ledesma E, Mendoza A, Chávez F, Pérez-Gil S, Hernández S, Chaparro A. Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México, 1996.
17. ICEPO. Training Manual. “Assessment of vitamin A status by impression cytology.” The John Hopkins University School of Medicine. International Center for Epidemiologic and Preventive Ophthalmology. Baltimore MD. USA. 1988: p. 1-27
18. Institute of Medicine. Dietary reference intakes of energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Ed. 5. Washington: National Academy of Science, 2002.
19. Hossain MM, Glass RL. Parental son preferences in seeking medical care for children less than five years of age in a rural community in Bangladesh. *Am J Public Health* 1998; 78: p.1349-50
20. Sharma V, Sharma A. Is the female child being neglected? Immunization in India. *Health Policy Plan* 1991; 6: 287-90.
21. Vásquez-Garibay E. Trato diferencial por género en relación con la nutrición y atención de la salud de la niña lactante y preescolar. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2000; 57: 176-82
22. Barquera S, Rivera JA, Safdie M, Flores M, Campos NI, Campirano F. Energy and nutrient intake in preschool and school age mexican children: National Nutrition Survey 1999. *Salud Pública Mex* 2003; 45: S540-50.
23. Underwood BA. Hypovitaminosis A: International Programmatic Issues. *J Nutr* 1994; 124: 1467S-1472S
24. Mora JO, Gueri M, Mora OL. Vitamin A deficiency in Latin America and the Caribbean: An overview. *Pan Am J Public Health.* 1998; 4(3): 178-185
25. Díaz JR, de las Cagigas A, Rodríguez R. Micronutrient deficiencies in developing and affluent countries. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57: (Suppl 1): S70-72
26. Allen LH. Nutritional influences on linear growth: a general review. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: S75-89
27. Long KZ, Montoya Y, Hertzmark E, Santos JI, Rosado JL. A double-blind randomized, clinical trial of the effect of vitamin A and zinc supplementation on diarrheal disease and respiratory tract infections in children in México City, México. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 693-70.
28. DRI. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC: National Academy Press 2000: p. 82-161.

Recibido: 27-01-2009

Aceptado: 05-04-2009

## Efecto de una bebida láctea con DHA en la composición de ácidos grasos del glóbulo rojo, de la leche materna y en el recién nacido

*Eduardo Atalah S, Marcela Araya B, Gastón Rosselot P, Héctor Araya L, Gloria Vera A, Ramón Andreu R, Catalina Barba G, Lorena Rodríguez*

Facultad Medicina, Universidad Chile, Gerencia Desarrollo & Calidad, Watt's SA,  
Departamento de Alimentos y Nutrición, Ministerio de Salud. Santiago, Chile

**RESUMEN.** En Chile el consumo de EPA y DHA es mucho menor a las recomendaciones internacionales. Para mejorar el aporte de omega-3 en el embarazo y lactancia desarrollamos una bebida láctea fortificada con 60 mg de DHA y 14 mg de EPA por 200/ml. El objetivo del estudio fue evaluar su efecto en embarazo, parto y recién nacido, composición lipídica de los glóbulos rojos y de la leche materna. Se estudió una cohorte de embarazadas que recibieron dos Kg/mes del nuevo producto (GE n = 175) o la misma cantidad de la leche en polvo que distribuye el Ministerio de Salud (GC n = 177). Se analizó consumo de la bebida láctea y otros alimentos fuentes de EPA y DHA y las características del embarazo, parto y recién nacido. En una submuestra de cada grupo se analizó al ingreso y a los 60 días la composición de los ácidos grasos de membranas del glóbulo rojo de la madre y de la leche materna a los 2 meses post parto. El 16 y 53% de la muestra no consumía pescado o mariscos respectivamente y menos del 25% consumía pescado en forma semanal. La intervención aumentó el aporte diario de DHA de 48,8 mg (IC 38,7 – 57,5) a 147,8 mg (IC 128,4 – 167,9) ( $p < 0,001$ ). El GE tuvo mayores niveles de DHA en los fosfolípidos de la membrana del glóbulo rojo materno: 17,9% (IC 12,9 – 23,0) versus 11,1% (IC 10,2 – 13,0)  $p < 0,002$  y aumentó en 50% la concentración de ácidos grasos omega-3 en la leche materna ( $p 0,06$ ). Se observó menor prevalencia de partos pretérminos en el GE (2,8 vs 10,6%), aunque sin significación estadística. La bebida láctea logró un aumento significativo del consumo de DHA en el embarazo y lactancia y una mejoría de la composición de ácidos grasos en el glóbulo rojo y leche materna, sugiriendo que es una buena estrategia de intervención en esta población.

**Palabras clave:** Embarazo, lactancia, DHA, EPA, omega-3, fortificación.

**SUMMARY.** Consumption of a DHA-enriched milk drink by pregnant and lactating women, on the fatty acid composition of red blood cells, breast milk, and in the newborn. EPA and DHA consumption in Chile is markedly below international daily intake recommendations. For improvement of such low intake level, we developed a fortified powdered dairy drink, containing 60 mg/serving of DHA and 14 mg/serving of EPA. Objectives: to evaluate the effects of DHA consumption during pregnancy, parturition, and in the newborn, on lipid composition of red blood cell membranes and levels of DHA and EPA on human milk during lactation. One hundred and seventy five (175) pregnant women received 2 kg/month of the fortified powdered dairy drink (GE), and 177 received the regular milk provided by the Ministry of Health (GC). We monitored daily intake of the dairy drink and all other sources of DHA and EPA in the diet, and measured general biological indicators during pregnancy, parturition, and in the new born. On a subsample of 14 women on each group (GE and GC), we measured fatty acid composition of red blood cell membranes after 0 and 60 days of consumption with the fortified dairy drink, and levels of DHA and EPA on human milk after 2 months of lactation. Of all women in the study, 16% had no consumption of fish, and 53% had no consumption of sea food. Less than 25 % of all women had fish on a weekly basis. Consumption of the fortified dairy drink tripled intake of DHA, from 48.8 mg/day (CI 38.7-57.5) to 147.8 mg/day (CI 128.4-167.9) ( $p < 0.001$ ). The GE group had a higher content of DHA on the phospholipids of red blood cell membranes: 11.1% (CI 10.2-13.0) versus 17.9% (CI 12.9-23.0) ( $p < 0.002$ ). Concentration of DHA and w-3 fatty acids increased 50% in milk of women consuming the fortified dairy drink ( $p < 0.06$ ). There was a lower incidence of preterm parturitions on the GE group (2.8 vs 10.6%), but without statistical significance. The consumption of the fortified dairy drink produced a significant increase of DHA consumption during pregnancy and lactation, and an improved composition of red blood cell membranes, as well as in human milk, proving to be an appropriate intervention strategy for the target population.

**Key words:** Pregnancy, lactation, DHA, EPA, fortification.

## INTRODUCCION

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la familia omega-3 son esenciales a través de todo el ciclo vital, especialmente el ácido eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA). Un mayor consumo de estos ácidos grasos en el embarazo y lactancia se ha asociado a un mejor desarrollo cognitivo y visual del niño los primeros años de vida (1-4) y en menor grado a una mayor duración de la gestación (5). Estudios más recientemente han estado orientados a evaluar sus efectos en la salud cardiovascular (6-9) y mental del adulto y adulto mayor (10-13).

No hay consenso sobre los niveles de consumo óptimo de DHA en las distintas etapas de la vida, pero la mayor parte de los grupos técnicos lo sitúan entre 200 y 500 mg/día en la población adulta (5). En Chile, el consumo de pescado o de otros alimentos de origen marino es muy bajo, lo que determina un aporte de DHA del orden de sólo 50 mg/día, muy por debajo de las recomendaciones y de lo observado en otros países (14-16).

Las principales alternativas para mejorar el aporte de DHA son fomentar un mayor consumo de pescado, utilizar suplementos de aceites marinos o alimentos funcionales que contengan DHA, demostrándose en general la efectividad de estas medidas (17-21). Un estudio nacional mostró un aumento significativo de los ácidos grasos omega-3 de la leche materna con una suplementación de 160 gramos 2 veces por semana de un pescado graso en conserva (jurel), efecto que no se mantuvo al suspender la suplementación (22,23). Ello sugirió la necesidad de explorar otras formas de intervención que logren una mejor sustentabilidad, optándose por el desarrollo de un bebida láctea enriquecida con DHA para las embarazadas y nodrizas beneficiarias del Programa Nacional de Alimentación Complementaria del Ministerio de Salud, que representan al 65% de la población nacional.

El alimento se elaboró a partir de leche en polvo y cereales hidrolizados fortificados con vitaminas, minerales y con ácidos grasos omega-3 microencapsulados que aportan 60 mg de DHA y 14 de EPA por cada porción de 200 ml (24). El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de este producto en el aporte de DHA a través de la dieta, su efecto en el embarazo, parto, recién nacido y en la composición lipídica de los glóbulos rojos de la embarazada y de las grasas de la leche materna. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y de los respectivos servicios de salud, donde se desarrolló.

## MATERIAL Y METODO

**Selección de la muestra.** Diseño semiexperimental en una cohorte de embarazadas controladas en cinco centros de atención primaria de Santiago del sistema público de salud. En

forma aleatoria las embarazadas fueron asignadas al grupo experimental (GE n = 175) que recibió dos kg mensuales de la bebida láctea con DHA o grupo control (GC n = 177), que recibió 2 kg. mensuales de la leche en polvo del programa del Ministerio de Salud (26% materia grasa, fortificada con hierro, zinc y vitamina C). la bebida láctea se diluye al 12%, lo que permitiría el consumo de tres raciones diarias de 200 ml. El alimento fue entregado gratuitamente en los dos grupos desde el primer control prenatal hasta los dos meses post parto.

Los criterios de inclusión fueron: firma del consentimiento informado por parte de la madre, primer control prenatal < de 14 semanas de embarazo, edad  $\geq$  18 años, embarazo único y ausencia de patologías crónicas que afecten la evolución del embarazo o el crecimiento fetal (enfermedades hepáticas, renales, diabetes, etc.).

La estimación del tamaño de muestra se basó en el test de Wilcoxon para variables continuas: incremento de peso durante el embarazo, consumo de DHA o peso del recién nacido. Se consideró nivel de significación 0,05, valor de  $p_1 = 0,4$  (probabilidad de que un valor en el grupo experimental sea menor que en el grupo control), test de dos colas y poder 80, lo que determinó la necesidad de estudiar 131 mujeres en cada grupo. Considerando una pérdida del 25% la muestra se aumentó a 175 madres en cada grupo.

**Encuesta de consumo.** Las madres fueron entrevistadas en tres oportunidades durante el embarazo y a los dos meses post parto para obtener información sobre el consumo del alimento los dos días previos a la encuesta. En la última entrevista del embarazo se aplicó además una encuesta de tendencia de consumo para evaluar la frecuencia y cantidad de consumo habitual de distintas variedades de pescados y mariscos. No se consideraron alimentos fuentes de ácido alfa linoléico. A partir de esta información se calculó la mediana de consumo diario de estos alimentos y el consumo de EPA y DHA utilizando la tabla chilena de composición de ácidos grasos (25).

**Información sobre la madre y recién nacido.** De los registros del centro de salud y de la maternidad se obtuvo información sobre las patologías presentadas durante el embarazo, incremento de peso materno, edad gestacional al parto, peso y puntaje Apgar del recién nacido.

**Obtención de muestras de sangre.** Previo ayuno de 12 horas se obtuvo por punción venosa 5 ml. de sangre en 14 madres del GC y 11 en el GE, en un tubo con EDTA, y fue trasladada en cadena de frío antes de 2 horas y almacenada a  $-80^{\circ}$  C hasta su análisis. La muestra se tomó al momento de ingresar al estudio y en las mismas madres, 60 días después. El tamaño de muestra se estimó considerando un aumento del 50% del DHA en el grupo intervenido, desviación estándar

común 5%, nivel de significación 0,05, poder del test 80 y test de una cola, para lo cual se requerían 14 madres en cada grupo.

Las membranas de los glóbulos rojos se separaron según Huertas et al (26), y los lípidos de las membranas se extrajeron según Bligh y Dyer (27). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron cuantificados por cromatografía gaseosa empleando un Cromatógrafo Hewlett- Packard modelo 6890, equipado con una columna capilar apolar (50 m, x 0.22 mm; BPX 70).

**Obtención de muestras de leche materna.** A los  $60 \pm 10$  días postparto se obtuvo en condiciones estandarizadas en 16 mujeres de cada grupo una muestra de leche. En el Centro de Salud o su propio domicilio se solicitó a la madre que amamantara al hijo y extraer manualmente 5 ml de leche cuando estaba terminando el primer pecho. Las muestras fueron trasladadas en cadena de frío y almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$ . Posteriormente fueron procesadas de acuerdo al método de Lepage-Roy<sup>22</sup>, por transesterificación directa de los lípidos. El análisis de los ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo gas-líquido Perkin Elmer Autosystem XL, con inyector automático y FID, utilizando una columna capilar BPX 70 x .25 mm DI, determinándose áreas bajo la curva por un programa computacional. Los ácidos grasos fueron identificados por los tiempos de retención, en relación a estándares de ácidos grasos y los valores obtenidos fueron expresados como porcentaje del total de ácidos grasos.

**Análisis estadísticos.** Los datos fueron procesados con el programa STATA 9.2. Se analizó la normalidad de cada variable a través del test de Shapiro-Wilk. Para la comparación entre grupos se usaron promedios y desviaciones estándar en variables continuas con distribución normal, el test de Wilcoxon y de Kruskal Wallis en variables sin distribución normal y  $\chi^2$  en variables categóricas. En todos los casos se consideraron significativos valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Ingresaron al estudio 352 embarazadas, 175 en el grupo intervenido y 177 en el grupo control, con características generales similares, que reflejan bien a las beneficiarias del sistema público de atención primaria en Chile (Tabla 1).

Durante el seguimiento hubo una pérdida importante de la cohorte inicial, ya sea por cambios de domicilio, inasistencias a control o por solicitud de las propias madres de retirarse del estudio. Se logró obtener información del parto sólo en 96 mujeres del grupo control (55% del grupo inicial) y 63 del grupo con Bebida Láctea (36% del grupo inicial). No hubo diferencias significativas en las principales variables analizadas en el grupo que abandonó el estudio respecto al que continuó en la cohorte.

TABLA 1  
Características generales de las madres participantes en el estudio

Variable	Grupo experimental n = 175 X $\pm$ DE	Grupo control n = 177 X $\pm$ DE	p
Edad (años)	26,7 $\pm$ 7,4	25,0 $\pm$ 6,7	NS
Escolaridad (años)	10,8 $\pm$ 2,4	10,4 $\pm$ 3,0	NS
Paridad	1,2 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 1,2	NS
Peso inicial (kg)	64,3 $\pm$ 12,1	60,4 $\pm$ 10,8	NS
Talla (cm.)	156,4 $\pm$ 5,4	157,5 $\pm$ 5,6	NS
Edad gestacional (semanas)	10,5 $\pm$ 2,9	10,2 $\pm$ 2,9	NS

n = número de participantes; DE = desviación estándar; NS = no significativo.

Menos del 25% de la muestra estudiada consumía pescado en forma semanal y sólo el 4%  $\geq 2$  veces a la semana y el 16 y 53% no consumía pescado ni mariscos, respectivamente. Ello determinó una mediana de consumo de pescado del orden de 100 g. semanales y de DHA cercana a los 50 mg/día a partir de la alimentación habitual (Tabla 2). La intervención con la bebida láctea permitió un aporte adicional de DHA equivalente al doble del consumo de la dieta, con diferencias significativas respecto a los controles. A pesar de la bebida láctea fortificada sólo el 10% del grupo intervenido logró un consumo diario de DHA de 200 mg o más.

El consumo promedio de la bebida láctea fue  $1,5 \pm 1,0$  tazas diarias durante el embarazo y  $1,8 \pm 1,0$  en la lactancia, cifra inferior a las tres tazas programadas de acuerdo a la cantidad de producto que se entregó a cada beneficiaria (24).

La composición de ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana del glóbulo rojo al ingresar al estudio y 60 días después, se presenta en la Tabla 3. Ambos grupos tenían características similares en el primer control prenatal, con predominio de ácidos grasos saturados, sin diferencias significativas entre ellos, a excepción de un mayor porcentaje de grasas monoinsaturadas en el grupo control. A los 2 meses se observó un aumento del porcentaje de EPA y DHA y un cambio favorable en la relación con el ácido araquidónico, en el grupo intervenido. El aumento fue especialmente importante en EPA, con niveles finales cuatro veces mayores respecto al valor inicial en el grupo experimental ( $p < 0,01$ ). Al comparar la línea basal con los 60 días también se observaron algunos cambios positivos en el grupo control: disminución de los ácidos grasos saturados y aumento de los monoinsaturados y DHA.

TABLE 2  
Mediana de consumo diario de pescados y mariscos y ácidos grasos omega-3  
en los grupos experimental y control

Consumo diario	Grupo experimental n = 175 p <sub>50</sub> (95% I.C.)	Grupo control n = 177 p <sub>50</sub> (95% I.C.)	p
Pescados (gramos)	17,1 (15,5–33,0)	14,0 (11,4–17,1)	NS
Mariscos (gramos)	0,0 (0– 2,0)	1,3 (0-2,7 )	NS
Pescados y mariscos (g)	18,1 (15,4 – 3,0)	18,8 (15,1–23,0)	NS
DHA dieta (mg)	54,9 (34,4– 75,2)	48,8 (38,7–57,5)	NS
EPA dieta (mg)	27,0 (17,1 – 33,8)	25,2 (19,5 – 30,7)	NS
DHA bebida láctea (mg)	96,8 (72,6 – 96,8)	-	NA
EPA bebida láctea (mg)	23,6 (17,7 – 23,6)	-	NA
DHA Total (mg)	147,8 (128,4 –167,9)	48,8 (38,7 – 57,5)	< 0,001
EPA Total (mg)	46,6 (37,9 – 57,1)	25,2 (19,5 – 30,7)	< 0,001

n = número de casos; DHA = ácido docosahexanoico; EPA = ácido eicosapentanoico;  
ARA = ácido araquidónico; IC = intervalo de confianza; NS = no significativo; NA = no aplicable

TABLE 3  
Perfil de ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana de glóbulos rojos al ingresar al estudio y a los 60 días  
en los grupos experimental y control, como porcentaje de las grasas totales (%)

Acidos grasos	Al ingreso		p	A los 60 días		p
	Grupo experimental n = 11 p <sub>50</sub> (95 I.C.)	Grupo control n = 14 p <sub>50</sub> (95 I.C.)		Grupo experimental n = 11 p <sub>50</sub> (95 I.C.)	Grupo control n = 14 p <sub>50</sub> (95 I.C.)	
Saturados (%)	46,4 (42,3 – 55,0)	42,8 (37,4- 45,4)	NS.	38,6 <sup>1</sup> (35,2 – 41,5)	32,9 <sup>1</sup> (31,1 – 36,4)	< 0,01
Monoinsaturados (%)	21,7 (16,5 – 23,5)	26,0 (21,8 – 30,5)	<0,05	22,2 <sup>2</sup> (16,6 – 48,5)	36,4 <sup>3</sup> (33,8 – 39,6)	NS
Poliinsaturados (%)	30,8 (26,4 – 36,5)	30,4 (27,5 – 36,0)	NS	44,0 <sup>3</sup> (35,5 – 46,7)	29,7 <sup>2</sup> (25,6 – 33,5)	< 0,01
Araquidónico (%)	18,0 (12,9 – 18,4)	17,1 (13,5 – 18,6)	NS	15,2 <sup>2</sup> (14,4 – 19,3)	14,1 <sup>2</sup> (12,8 – 16,9)	NS
EPA (%)	1,4 (1,1 – 2,4)	1,9 (1,5 – 3,4)	NS	5,7 <sup>3</sup> (3,0 – 6,2)	2,0 <sup>2</sup> (0,4 – 2,5)	< 0,01
DHA (%)	10,8 (7,9- 13,7)	8,0 (6,9 – 11,3)	NS	17,9 <sup>3</sup> (12,9 – 23,0)	11,1 <sup>3</sup> (10,2 – 13,0)	< 0,01
Araquidónico/DHA	1,3 (1,1 – 2,2)	1,9 (1,6 – 2,6)	NS	0,9 <sup>1</sup> (0,6 – 1,2)	1,3 <sup>1</sup> (1,0 – 1,4)	< 0,02

n= número de casos; DHA = ácido docosahexanoico; EPA = ácido eicosapentanoico; ARA = ácido araquidónico; IC = intervalo de confianza; NS = no significativo; <sup>1</sup> Comparación entre 0 y 60 días p < 0,05; <sup>2</sup> Comparación entre 0 y 60 días NS; <sup>3</sup> Comparación entre 0 y 60 días p < 0,01 Test de Kruskal Wallis para muestras independientes; Test de Wilcoxon para muestras pareadas.

El 18,8% de las madres presentó alguna patología durante el embarazo (datos no mostrados). Las patologías más frecuentes fueron hipertensión arterial y preeclampsia (6,7%), diabetes gestacional (6,0%), infecciones del tracto urinario

(2,7%) y colestasia gravídica (1,3%). No se observaron diferencias entre los grupos, salvo una tendencia a una mayor frecuencia de hipertensión y preeclampsia en el grupo control (8,3% v/s 4,6% NS).

La mayor parte de los partos fueron espontáneos, de término y con recién nacidos adecuados para la edad gestacional, sin diferencias significativas entre los grupos (Tabla 4). La prevalencia de partos pretérminos fue 3,8 veces mayor en el grupo control, valor que no alcanza significación estadística, pero que sigue la tendencia descrita en algunos estudios. La edad gestacional al parto y las características antropométricas de los recién nacidos fueron similares en ambos grupos, destacando un alto peso promedio al nacer y el resto de los valores en el rango normal.

TABLA 4  
Características del parto y recién nacido en los grupos experimental y control

Parto	Grupo experimental n = 63 %	Grupo control n = 96 %	p
Tipo de parto			
Espontáneo	61,9	59,4	
Fórceps	3,2	7,3	
Cesárea	34,9	33,3	NS
Edad gestacional			
= 37 semanas	2,8	10,6	
= 38 semanas	97,2	89,4	0,16
Peso según edad gestacional			
Adecuado edad gestacional	87,2	83,9	
Pequeño edad gestacional	4,3	3,6	
Grande edad gestacional	8,5	12,5	NS
Recién nacido	Grupo experimental X ± DE	Grupo control X ± DE	p
Edad gestacional (semanas)	39,3 ± 1,1	39,0 ± 1,5	NS
Peso (gramos).	3.448 ± 481	3437 ± 476	NS
Talla (cm)	49,7 ± 2,7	49,9 ± 2,5	NS
Circunferencia craneana (cm)	35,0 ± 1,5	34,8 ± 1,4	NS
Apgar 1	8,5 ± 0,6	8,3 ± 1,3	NS
Apgar 5	9,0 ± 0,3	9,1 ± 0,4	NS

n= número de casos; X = promedio; DE = desviación estándar; NS = no significativo.

En ambos grupos la concentración de DHA en leche materna fue bastante baja en relación a lo observado en países con mayor consumo de pescado. El grupo intervenido tuvo un 60% más de DHA en la leche materna, no estadísticamente significativo por la amplia variabilidad de esta variable y el reducido tamaño de muestra. También aumentó la concentración de omega-3 y mejoró la relación omega 6/omega 3, en el límite de la significación estadística (Tabla 5).

TABLA 5  
Perfil de ácidos grasos en leche materna en los grupos experimental y control, como porcentaje de las grasas totales

Acidos grasos	Grupo experimental P <sub>50</sub> (95% IC) n = 16	Grupo control P <sub>50</sub> (95% IC) n = 16	p
Grasas totales (g/100ml)	3,4 (2,3-4,2)	3,2 (1,8-4,4)	NS
AG Saturados(%)	39,7 (38,3-46,2)	42,8 (40,6-48,2)	NS
AG Monoinsaturados(%)	35,1 (33,6-37,3)	35,5 (33,6-37,3)	NS
AG Poliinsaturados(%)	23,2 (18,4-26,1)	19,5 (16,0-22,9)	NS
Alfa Linolénico(%)	1,53 (1,08-2,13)	1,06 (0,84-1,34)	< 0,05
EPA(%)	0,03 (0,03-0,04)	0,04 (0,02-0,04)	NS
DHA(%)	0,16 (0,08-0,20)	0,10 (0,03-0,17)	NS
Omega 3 total(%)	1,88 (1,33-2,49)	1,39 (0,96-1,73)	0,06
Omega 6/Omega 3	11,8 (10,1-13,0)	12,8 (11,316,3)	0,08

n = número de casos; AG = ácidos grasos; DHA = ácido docosahexanoico; EPA = ácido eicosapentanoico; ARA = ácido araquidónico; IC = intervalo de confianza; NS = no significativo.

## DISCUSION

Los múltiples beneficios del DHA en el embarazo y lactancia se encuentran ampliamente documentados en la literatura. La principal fuente de DHA en la dieta son los pescados, cuyo nivel de consumo es muy bajo en muchos países. Las guías de alimentación de la población chilena recomiendan el consumo de al menos dos porciones semanales de pescado durante el embarazo y lactancia, cifra que cumple menos del 5% de la población nacional a pesar de la extensa costa del país. Según los estudios de consumo aparente o hojas de balance que realiza FAO en cada país, en los últimos 20 años se ha triplicado en Chile el consumo de carnes (vacuno, cerdo, pollo) mientras que el consumo de pescado se mantiene estable y en niveles muy bajo, representando menos del 7% del consumo total de este grupo de alimentos.

Diversas estrategias de intervención pueden contribuir a mejorar esta situación, incluyendo campañas educativas, modificación de los programas de alimentación institucional, subsidios específicos para mejorar el acceso a la población de menores recursos, etc. Sin embargo su efecto necesariamente se verá en el mediano o largo plazo y su sostenibilidad es variable, como fue la experiencia en un estudio previo, donde la educación nutricional no fue suficiente para mantener los niveles de consumo después de suspender la entrega gratuita de una ración de pescado en conserva (23).

Otra estrategia está orientada al uso de suplementos de aceite de pescado, ya que una dosis diaria puede aportar la misma cantidad de DHA que 100g de pescado graso y bastante más que una porción de pescado de carne blanca. Muchas de

las intervenciones de la literatura se han basado en el uso de suplementos y han sido exitosas (17-21, 28). Un gran problema es como llevar los resultados de un estudio clínico controlado a una intervención a gran escala, donde la adhesividad al tratamiento probablemente puede ser baja en un segmento de la población.

Finalmente está la posibilidad de utilizar un alimento de consumo habitual que sea fortificado con DHA, tal como se ha hecho con otros micronutrientes (hierro, ácido fólico, vitamina A, yodo, etc.). Para lograr éxito a nivel de salud pública el alimento debe ser de consumo masivo en el grupo objetivo. Chile tiene la ventaja de que el Ministerio de Salud realiza desde hace varias décadas un programa de alimentación materno infantil, que beneficia regularmente al 65% de la población nacional, con especial énfasis en la población más vulnerable. Ello dio la oportunidad de desarrollar un producto fortificado especialmente orientado a las madres embarazadas y en lactancia, que tuvo una adecuada aceptabilidad en un estudio piloto.

El objetivo de este estudio fue evaluar su consumo y el aporte de DHA a la dieta habitual. En forma complementaria se evaluaron potenciales efectos beneficios en el embarazo, parto y recién nacido, aunque ellos son más difíciles de demostrar en una muestra relativamente pequeña de un estudio cuasi experimental. Una debilidad del estudio es la importante pérdida de la cohorte durante el seguimiento, llegándose a encuestar solo al 70% de la muestra al final del embarazo y obtener datos sobre el parto y recién nacido en solo el 45% de ellas. La pérdida fue algo mayor en el grupo experimental, fundamentalmente por la propia solicitud de las madres de retirarse del estudio. Este hecho en parte fue interpretado por una menor aceptabilidad del producto, aunque también puede haber influido la limitada información que se entregó a las madres sobre sus potenciales beneficios nutricionales. Estudios posteriores han demostrado que se mantiene una mejor aceptabilidad para la leche entera 26% de materia grasa que han estado recibiendo por varios años y que tiene la ventaja de poder ser compartido con el resto del grupo familiar. Para poder evaluar un posible sesgo por la pérdida muestral se analizaron las principales características del grupo que se mantuvo en el seguimiento respecto de aquellos que se retiraron, sin encontrarse diferencias entre ellos, lo que reduce esa posibilidad.

Los resultados demuestran que se logró triplicar el nivel de consumo de DHA respecto al grupo control, aunque no se lograron los niveles óptimos recomendados, ya que la ingesta real de la bebida láctea fue la mitad de lo esperado. El menor consumo podría ser explicado por algún grado de rechazo al producto, aunque también por que cerca del 40% de las mujeres no consumen leche en forma habitual (24). Ello sugiere la necesidad de reforzar la consejería nutricional orientada a incentivar un mayor consumo de lácteos y pescado. Otra

posibilidad es aumentar la concentración de DHA en la bebida láctea, aunque debieran hacerse estudios de estabilidad para evaluar la vida útil del producto y nuevos estudios de aceptabilidad y consumo. También es importante reevaluar las características organolépticas del producto, lo que ya se está haciendo.

De acuerdo a lo esperado la intervención modificó favorablemente la composición de los ácidos grasos de la membrana de los glóbulos rojos, aunque no se evidenciaron efectos positivos en la evolución del embarazo, parto y recién nacido. Sin embargo debe tenerse en cuenta que la población estudiada es de bajo riesgo, con buen estado nutricional inicial, adecuadamente controlada, con un incremento promedio de peso durante la gestación de  $13,2 \pm 5,0$  kg y con peso promedio al nacer de  $3.440 \pm 480$  gramos, donde es difícil modificar los resultados. Se observó una reducción importante de los partos pretérminos, aunque no significativa, lo que requiere ser estudiado en una muestra de mayor tamaño.

Se logró un aumento de 50% en la concentración de ácidos grasos omega-3 en la leche materna, que no fue estadísticamente significativa, probablemente por el reducido tamaño de muestra y el insuficiente nivel de consumo total de DHA alcanzado. Sin embargo, aún después de la suplementación la concentración de DHA en la leche materna fue menos de la mitad observada a nivel mundial y menos del 15% de los valores se ubicaron en el intervalo superior, lo que refuerza la necesidad de utilizar otras medidas complementarias para mejorar el consumo de estos ácidos grasos (29).

A pesar de estas limitaciones, el estudio permitió demostrar que la intervención era factible, lo que contribuyó a que el Ministerio de Salud incorporara este alimento a nivel nacional. Desde agosto del 2008 cerca de 200 mil embarazadas y nodrizas del país están recibiendo regularmente este producto, lo que permitirá poder realizar una nueva evaluación de impacto a mayor escala.

## REFERENCIAS

1. Carlson SE. Docosahexaenoic acid supplementation in pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89 : 678S-84S.
2. Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campoy C, Cetin I, Decsi T, Dudenhausen JW, Dupont C, Forsyth S, Hoesli I, Holzgreve W, Lapillonne A, Putet G, Secher NJ, Symonds M, Szajewska H, Willatts P, Uauy R; World Association of Perinatal Medicine Dietary Guidelines Working Group. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med.* 2008; 36: 5-14.
3. Bergmann RL, Haschke-Becher E, Klassen-Wigger P, Bergmann KE, Richter R, Dudenhausen JW, Grathwohl D, Haschke F. Supplementation with 200 mg/day docosahexaenoic

- acid from mid-pregnancy through lactation improves the docosahexaenoic acid status of mothers with a habitually low fish intake and of their infants. *Ann Nutr Metab.* 2008; 52:157-66.
4. Mendez MA, Torrent M, Julvez J, Ribas-Fitó N, Kogevinas M, Sunyer J. Maternal fish and other seafood intakes during pregnancy and child neurodevelopment at age 4 years. *Public Health Nutr.* 2008; 25:1-9.
  5. Koletzko B, Cetin I, Brenna JT; Perinatal Lipid Intake Working Group; Child Health Foundation; Diabetic Pregnancy Study Group; European Association of Perinatal Medicine; European Association of Perinatal Medicine; European Society for Clinical Nutrition and Metabolism; European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Committee on Nutrition; International Federation of Placenta Associations; International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Br J Nutr.* 2007; 98: 873-7.
  6. Breslow JL. n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1477S-1482S
  7. Kelley DS, Siegel D, Fedor DM, Adkins Y, Mackey BE. DHA supplementation decreases Serum C-reactive protein and other markers of inflammation in hypertriglyceridemic men. *J Nutr.* 2009;139: 495-501.
  8. Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Omega-3 fatty acids: how can they be used in secondary prevention? *Curr Atheroscler Rep.* 2008; 10 : 510-7.
  9. Harris WS, Kris-Etherton PM, Harris KA. Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults. *Curr Atheroscler Rep.* 2008; 10: 503-9.
  10. Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr.* 2008;138: 25: 10-4.
  11. Pomponi M, Di Gioia A, Bria P, Pomponi MF. Fatty aspirin: a new perspective in the prevention of dementia of Alzheimer's type?. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5 : 422-31.
  12. Samieri C, Féart C, Letenneur L, Dartigues JF, Pérès K, Auriacombe S, Peuchant E, Delcourt C, Barberger-Gateau P. Low plasma eicosapentaenoic acid and depressive symptomatology are independent predictors of dementia risk. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88: 714-21.
  13. Van de Rest O, Geleijnse JM, Kok FJ, van Staveren WA, Dullemeijer C, Olerikert MG, Beekman AT, de Groot CP. Effect of fish oil on cognitive performance in older subjects: a randomized, controlled trial. *Neurology.* 2008;71: 430-8.
  14. Atalah E, Araya H, Rosselot G, Pinheiro AC, Araya M, Vargas V. Consumo de pescado, mariscos, EPA y DHA en gestantes de la Región Metropolitana. Primer Congreso Chileno de Salud Pública, Determinantes de la Salud: Resumen 17, Santiago, Chile, 2007
  15. Franke C, Verwied-Jorky S, Campoy C, Trak-Fellermeier M, Decsi T, Dolz V, Koletzko B. Dietary intake of natural sources of docosahexaenoic acid and folate in pregnant women of three European cohorts. *Ann Nutr Metab.* 2008;53(3-4):167-74.
  16. Van Eijsden M, Hornstra G, van der Wal MF, Bonsel GJ. Ethnic differences in early pregnancy maternal n-3 and n-6 fatty acid concentrations: an explorative analysis. *Br J Nutr.* 2008; Nov 5:1-8.
  17. Dunstan JA, Mitoulas LR, Dixon G, Doherty DA, Hartmann PE, Simmer K, Prescott SL. The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. *Pediatr Res* 2007;62 :689-94.
  18. Van Goor SA, Dijck-Brouwer DA, Hadders-Algra M, Doornbos B, Erwich JJ, Schaafsma A, Muskiet FA. Human milk arachidonic acid and docosahexaenoic acid contents increase following supplementation during pregnancy and lactation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 ;80: 65-9.
  19. Krauss-Etschmann S, Shadid R, Campoy C, Hoster E, Demmelmair H, Jiménez M, Gil A, Rivero M, Veszprémi B, Decsi T, Koletzko BV; Nutrition and Health Lifestyle (NUHEAL) Study Group. Effects of fish-oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:1392-400.
  20. Szajewska H, Horvath A, Koletzko B. Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of women with low-risk pregnancies on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 1337-44.
  21. Judge MP, Harel O, Lammi-Keefe CJ. A docosahexaenoic acid-functional food during pregnancy benefits infant visual acuity at four but not six months of age. *Lipids.* 2007 ; 42:117-22.
  22. Gaete MG, Atalah ES, Araya JA. Efecto de la suplementación de la dieta de la madre durante la lactancia con ácidos grasos omega 3 en la composición de los lípidos de la leche. *Rev Chil Pediatr.* 2002; 73: 239-47.
  23. Gaete MG, Atalah ES. Niveles de LC-PUFA n-3 en la leche materna después de incentivar el consumo de alimentos marinos. *Rev Chil Pediatr.* 2003; 74: 158-65.
  24. Atalah E, Vera G, Rosselot G, Araya H, Andreu R, Alviña A, Araya M y cols. Desarrollo, consumo y aceptabilidad de una Bebida Láctea con DHA para embarazadas y nodrizas. *Rev Chil Nutr* 2008; 35: 433-42.
  25. Masson L, Mella MA. Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile: composición en ácidos grasos. Editorial Universitaria, Santiago 1985.
  26. Huertas JR, Palomino N, Ochoa JJ, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Battino M, Robles R, Mataix J. Lipid peroxidation and antioxidants in erythrocyte membranes of full-term and preterm newborns. *Biofactors.* 1998; 8: 133-7.
  27. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37: 911-917.
  28. Helland IB, Saugstad OD, Saarem K, Van Houwelingen AC, Nylander G, Drevon CA. Supplementation of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation reduces maternal plasma lipid levels and provides DHA to the infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006;19: 397-406.
  29. Brenna JT, Varamini B, Jensen RG, Diersen-Schade DA, Boettcher JA, Arterburn LM. Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85: 1457-64.

Recibido: 14-04-2009

Aceptado: 07-07-2009

## Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women

*Phuong H. Nguyen, Ruben Grajeda, Paul Melgar, Jessica Marcinkevage, Ann M. DiGirolamo, Rafael Flores, Reynaldo Martorell*

Emory University, Atlanta, GA. Pan American Health Organization, Washington, DC. Institute of Nutrition of Central America and Panama Guatemala. Centers for Disease Control and Prevention, Chamblee, GA, USA

**SUMMARY.** Evidence for the impact of micronutrient supplementation trials on depression in women from developing countries is limited. This study examines this association and compares the impact of weekly versus daily combinations of micronutrient supplements on symptoms of depression. A randomized, positive-controlled trial was conducted in Guatemala. A total of 459 women were assigned randomly to 4 groups to receive weekly (5,000 or 2,800µg) or daily (400 or 200 µg) folic acid (FA) plus iron, zinc and vitamin B-12 for 12 weeks. Depression was measured using the Center for Epidemiologic Studies-Depression 20-item Scale (CES-D). A score=16 was used as an indication of depression. The association between micronutrient status and depression was assessed using baseline data. Generalized linear regression models were used to assess treatment effects. The baseline mean CES-D score was 17.1±8.5 and the prevalence of depression was 49.3%. Women in the lowest tertile of red blood cell folate (RBC) were 1.7 times more likely to be depressed than those in the highest tertile (OR=1.71; 95% CI: 0.91, 3.18). There were no associations between depression and serum folate, homocysteine, vitamin B-12, hemoglobin, ferritin or zinc ( $p > 0.05$ ). Mean depression scores decreased by 2.3 points post-intervention and depression decreased to 37.7%, with no differences in degree of improvement by group ( $p = 0.64$ ). Low RBC folate was associated with elevated symptoms of depression at baseline. Supplementation with FA-containing micronutrients may be equally efficacious in improving symptoms of depression when provided daily or weekly. Our findings that poor folate status may increase depression needs to be further investigated. **Key words:** Depression, folate, micronutrients, randomized controlled trial, women of reproductive age, Guatemala.

**RESUMEN. Potencial reducción de síntomas de depresión en mujeres en Guatemala mediante la suplementación con micronutrientes.** La evidencia del impacto de ensayos de suplementación con micronutrientes en mujeres con depresión en países en desarrollo es limitada. El presente estudio examina esta asociación y compara el impacto de varias combinaciones de micronutrientes proporcionadas de manera semanal o diaria en los síntomas de depresión, utilizando datos de un ensayo controlado (control positivo) y aleatorizado realizado en Guatemala. Un total de 459 mujeres fueron asignadas al azar entre cuatro grupos para recibir semanalmente (5.000 o 2.800 µg) o diariamente (400 o 200 µg) de ácido fólico (AF) combinado con hierro, cinc y vitamina B-12 durante 12 semanas. La depresión fue medida utilizando la escala de 20 ítems del Centro de Estudios Epidemiológicos de la Depresión (CES-D). Un puntaje =16 fue considerado indicativo de depresión. Se evaluó la asociación entre el nivel de micronutrientes en sangre y depresión utilizando datos provistos por la línea de base. Se utilizaron modelos de Regresión Lineal Generalizada para evaluar los efectos del tratamiento. La media del puntaje de la línea de base CES-D fue de 17,1±8,5 y la prevalencia de depresión fue del 49,3%. Las mujeres en el tercil más bajo del folato eritrocitario presentaron 1,7 veces más probabilidades de estar deprimidas que aquellas en el tercil más alto (OR=1,71; 95% CI: 0,91, 3,18). No se encontró asociación entre depresión y folato sérico, homocisteína, vitamina B-12, hemoglobina, ferritina sérica o cinc ( $p>0,05$ ). Los puntajes de depresión medios post-intervención disminuyeron en 2.3 puntos y la depresión se redujo a 37,7%, sin presentar diferencias en el grado de mejoría por grupo ( $p=0,64$ ). En síntesis, el bajo nivel de folato eritrocitario se asoció a síntomas elevados depresivos en la línea de base. La suplementación con AF sumado a otros micronutrientes puede ser igualmente eficaz en la mejora de síntomas depresivos cuando provista diaria o semanalmente. Nuestros resultados sugieren que bajos niveles de folato eritrocitario incrementan la depresión, pero esta afirmación requiere del desarrollo de futuras investigaciones. **Palabras clave:** Depresión, folato, micronutrientes, experimentos aleatorizados, mujeres en edad reproductiva, Guatemala.

## INTRODUCTION

Depression is a significant public health problem in both developed and developing countries, affecting 10-25% of women of reproductive age (1). Depression is one of the leading causes of disease-related disability for women (2) and also has adverse effects on birth outcomes, parenting and child development (3,4).

There is some evidence that micronutrient deficiencies – particularly iron, zinc, vitamin B-12 and folate – may be linked to depression. Iron deficiency has been shown to affect neurotransmitter synthesis (5) and is associated with depression in postpartum women (6,7). Zinc deficiency has also been associated with depression in cross-sectional (8), case-control studies (9,10) and small trials (11,12).

Various sources suggest an association between folate levels and depression. Clinical studies report higher risk of major depression, greater severity of depression (13,14), and decreased response to anti-depressants (15,16) among patients with low folate status. At the community level, some cross-sectional study findings suggest an association between low folate levels and increased risk of depression (17-18,19,20,21,22). Other findings reported an association in middle-aged women, but not in elderly women or men (23) or no evidence of a relationship (24). Low dietary folate intake was found to increase risk for depression in Finnish and Japanese men (25,26) but not in women (26,27). Folate deficiency also leads to elevated homocysteine (Hcy) which has been associated with depression in some (17,21-23,28) but not all studies (18,20,24). Lastly, several controlled trials in patients with symptoms of depression show that combining antidepressant medication with FA enhances therapeutic effects (29-30,31,32). A placebo-controlled trial of FA supplementation (100 µg/d for 6 weeks followed by 200 µg/d for a further 6 weeks) carried out in healthy Irish men found no effect but the study was underpowered (n=23) (33).

Evidence of the relationship between vitamin B-12 and depression are mixed; some studies show an inverse relationship (22,24,34), while others report no association (23). An RCT of folate, B-12 and B-6 in Australian women found no effects on mood (35).

Folate and vitamin B-12 may be involved in the pathology of depression through three main mechanisms: 1) folate and vitamin B-12 play a critical role in the methylation pathways which can influence the synthesis and metabolism of neurotransmitters (36); 2) low folate status leads to increased Hcy concentrations, and elevated Hcy can generate reactive oxygen species, promoting oxidative stress (14) which may contribute to vascular injury and cerebral dysfunctions; and 3) low folate status influences the rate of synthesis of tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), a cofactor in the hydroxylation of phenylalanine and tryptophan, which are necessary for the

synthesis of dopamine and serotonin (14), both shown to be involved in the etiology of depression.

Studies in Guatemala show a high prevalence of micronutrient deficiencies. Anemia is prevalent, especially in women of rural and indigenous populations (37). Zinc deficiency is presumed to be a common problem due to diets high in phytate (38) and low in animal protein (39). Low vitamin B-12 levels have also been reported (40). Finally, the country's high incidence of neural tube defects (41,42) suggest significant folate deficiency, though there are no national folate deficiency data.

Few studies outside the clinic setting have examined the association between micronutrient status and depressive disorders in women of reproductive age, particularly in developing countries. Additionally, few community-based supplementation trials have explored the preventive potential of micronutrients for depressive disorders. Therefore, the current study was conducted among reproductive-age Guatemalan women with two objectives:

1. Assess the association between micronutrient status (folate, vitamin B-12, Hcy, iron and zinc) and symptoms of depression.
2. Compare the impact of weekly versus daily supplements containing FA and other micronutrients on symptoms of depression.

## MATERIALS AND METHODS

### Study context, design and participants

The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Roosevelt, Guatemala City, Guatemala and Emory University's Institutional Review Board, Atlanta, Georgia, USA. Written informed consent was obtained from every participant. The results reported here are from a randomized controlled trial (RCT) designed to assess the impact of supplementation with different doses of weekly versus daily FA plus other micronutrients on folate status. The study design, trial profile and characteristics of the study sample have been described in detail elsewhere (43). Briefly, 459 healthy women aged 15-49 years were recruited from Concepción, Chiquirichapa, in the western highlands of Guatemala. Women who were pregnant, lactating (having had a child within the last three months), consuming FA supplements, diagnosed with a chronic disease that interferes with FA metabolism, or severely anemic (Hb < 70 g/L) were not admitted into the study. Women with severe anemia were provided 90 tablets containing 120 mg of iron for daily use and referred to the local health clinic. All women eligible for inclusion into the study were assigned randomly to receive one of four supplements: 1) 5000 µg FA+120 mg iron+30 mg Zn + 16.8 mcg B-12/week 2) 2800 µg FA+120 mg iron+16.8 mcg

B-12/week 3) 400 µg FA+ 60 mg iron+ 15 mg Zn + 2.4 mcg B-12/day, and 4) 200 µg FA+ 60 mg iron+2.4 mcg B-12/day (Table 1). Supplementation lasted 12 weeks, between March and June 2006. Trained field workers from the community visited each woman 7 days a week to deliver and observe supplement ingestion for the entire 12-wk period. All women received 7 pills /week. The weekly dose groups received 1 active pill on the 3<sup>rd</sup> day of the week and placebo on the other 6 days. 422 women completed the trial, with no differences in loss to follow up by group.

TABLE 1  
Arms of the double-blind, randomized controlled trial

Groups	Periodicity	FA	Fe	Zn	B-12
1	Weekly	5000 µg	120 mg	30 mg	16.8 µg
2	Weekly	2800 µg	120 mg	0	16.8 µg
3	Daily	400 µg	60 mg	15 mg	2.4 µg
4	Daily	200 µg	60 mg	0	2.4 µg

## Measurements

**Assessment of symptoms of depression:** The presence of symptoms of depression was assessed pre- and post-supplementation using the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D scale) (44). The CES-D scale is a self-reported 20-item checklist measuring symptoms of depression in the general population. Each question is scored on a scale of 0-3, yielding a range of possible scores of 0 to 60, with higher scores indicating increased severity of depression. A score = 16 is considered to be indicative of a significant level of symptoms of depression (44); here we refer to scores = 16 as indicating “depression”. Women receiving scores = 16 were referred to the attending psychologist at the local health clinic. Several studies have adapted this instrument for use with Spanish-speaking populations, confirming the high validity and reliability of this measure (45,46). The CES-D was translated to *Mam*, the community’s indigenous language, and checked for accuracy through back translation.

**Biochemical indicators of micronutrient status:** A finger-prick capillary blood sample was obtained to measure hemoglobin (Hb) concentrations using a B-Hemoglobin analyzer (Hemocue). Venous blood samples were collected after overnight fasting at baseline and post-intervention. Venous blood was centrifuged at 1500 x g for 10 minutes at 4°C. The serum was separated and stored at -70°C at the Institute of Nutrition of Central America and Panama (INCAP) in Guatemala City until analysis at the National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mexico. Serum and RBC folate

were determined by microbiological assays (47). Serum Hcy was measured by HPLC and fluorescence detection (48). Serum vitamin B-12, ferritin and C-reactive protein (CRP) were determined using a Nefelometric immunoassay reactive kit (Behring Diagnostics Inc.) (49). Serum zinc was measured by standard method with flame atomic absorption spectrophotometry (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc.) (50).

Dietary intakes were collected at baseline using a semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) developed by INCAP. This FFQ was shown to be valid for use in Guatemalan adults (51), and was adapted by INCAP for use in the *Mam* indigenous region.

**Other characteristics:** Participants were interviewed at baseline for information on their demographic background, level of education, current marital status, reproductive history, and health status. Socio-economic status (SES) was assessed using a questionnaire that included questions related to household size, occupation and education, water and sanitation, and household possessions. Morbidity data were collected using a questionnaire with 22 questions about symptoms in the last month, including gastrointestinal discomfort headache, fatigue, dizziness and fever. Body weight and height were measured to the nearest 0.1 kg or cm, respectively, and body mass index (BMI) was calculated as weight in kg over height in meters squared.

All interviewers were bilingual in *Mam* and Spanish and well-trained in interviewing techniques, ethical issues and administration of the questionnaires and standardized measurement techniques. Interviews were conducted in *Mam* or Spanish as appropriate.

## Trial profile

Among 459 women randomized for inclusion into the study, 37 women withdrew from the study due to several reasons, including pregnancy (n = 6), relocation (n = 4), time constraints (n = 3), disapproval of participation from relatives (n = 4), gastric discomfort or other side effects (n=6), and hospitalization due to other non-supplementation related health problems (n = 6). Those not continuing in the study had similar socio-economic and anthropometric characteristics as those who completed the study (p > 0.05, results not shown). Of the 422 participants completing the study, 370 (88%) provided both baseline and endline blood samples and are included in our analyses; 52 women refused to give blood at the end of intervention. Subjects included in the analyses had similar baseline characteristics to those not included in the analyses (P > 0.05, results not shown).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed on data from 369 subjects who provided both baseline and endpoint blood samples. Data were checked for normal distribution using the Kolmogorow-Smirnov test. SES index and morbidity scores were created using a principal component analysis according to the method used in previous INCAP studies (52). Baseline data were used for assessing the relationship between micronutrient status and symptoms of depression. Differences in the characteristics between depressed and non-depressed groups were examined by the Student's *t* test, the Mann-Whitney U test or the chi-square test. Subjects were also divided into tertiles according to their micronutrient status. Logistic regression models were used to assess associations between micronutrient status and symptoms of depression, controlling for potential confounding by age, education, marital status, SES, morbidity and number of pregnancies.

In order to assess the efficacy of supplementation, the baseline characteristics across treatment groups were compared using the ANOVA, Kruskal-Wallis test or the chi-squared analyses. The effect of treatment on depression was assessed by using a generalized linear regression model (SAS Proc Mixed procedures) (53). All statistical tests were two-sided and significance was reported for *p*-values < 0.05.

### Sensitivity analyses

Of the 20 items in the scale, 16 assess negative symptoms of depression and are scored on a scale of 0 to 3. Four of the items (4, 8, 12 and 16) assess positive symptoms and therefore the coding is reversed (3 to 0). Because of possible scaling problems with items 4 and 8, an 18-item modified scale has been proposed (54).

The commonly used cut-off point for identifying a higher level of depression is =16 but higher cut off points (= 22 or 24) have been used (55,56). To account for these differences, we repeated all analyses using the modified 18-item scale and a cut-off point of = 24 to see if results were consistent with the main analyses (original 20-item scale and cut-off point of =16).

## RESULTS

### Characteristics of the study sample

The characteristics of the study population stratified by baseline depression score are presented in Table 2. Nearly half of the subjects (49.3 %) had CES-D scores =16. Compared to non-depressed women, depressed women were significantly older (*p* = 0.001), had fewer years of schooling (*p* = 0.03), were more likely to be single, divorced or widowed (*p* = 0.02), were more likely to have a poor morbidity score (*p* < 0.01), and to have more pregnancies (*p* = 0.002).

TABLE 2  
Baseline characteristics of the study population by initial depression status<sup>1</sup>

Characteristics	Total (n=369)	CES-D ≥ 16 (n=182)	CES-D < 16 (n= 187)	P value <sup>2</sup>
Age (years)	31.1 ± 9.4	32.8 ± 9.3	29.5 ± 9.2	0.001
Education (years)	5.8 ± 3.8	5.3 ± 3.4	6.3 ± 4.1	0.03
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	26.0 ± 4.3	26.1 ± 4.2	25.8 ± 4.3	0.58
No. of Single /divorced/widowed mothers (%)	34 (9.2)	23 (12.6)	11 (5.9)	0.02
No. with Poor morbidity score (%)?	121 (32.8)	78 (42.9)	43 (23.0)	<0.01
Socioeconomic status				
No. High (%)	118 (32.2)	48 (26.7)	70 (37.6)	0.07
No. Medium (%)	118 (32.2)	65 (36.1)	53 (28.5)	
No. Low (%)	130 (35.5)	67 (37.2)	63 (33.9)	
Mean Number of pregnancies (± SD)	3.2 ± 3.0	3.7 ± 3.2	2.8 ± 2.8	0.002
Biochemical indicators				
RBC Folate (nmol/L)	436.8 ± 169.9	426.6 ± 181.1	446.8 ± 158.0	0.27
Serum folate (nmol/L)	31.7 ± 12.1	31.1 ± 12.2	32.3 ± 12.0	0.33
Homocysteine (µmol/L)	8.3 (6.7-10.0)	8.3 (6.3-10.1)	8.2 (6.7-10.0)	0.74
Vitamin B-12 (pmol/L)	325.0 (197.1-534.5)	342.3 (212.6-571.8)	294.8 (191.8-514.1)	0.17
Hemoglobin (g/L)	137.4 ± 15.5	137.3 ± 15.6	137.6 ± 15.4	0.83
Serum ferritin (µmol/L)	49.0 (25.1-83.6)	50.0 (29.1-93.0)	47.4 (23.4-80.1)	0.23
Zinc (µmol/L)	10.5 ± 2.1	10.6 ± 2.0	10.5 ± 2.2	0.81

<sup>1</sup> Values are mean ± SD, median (inter-quartile range) or n (%)

<sup>2</sup> Student *t* test for continuous variables that are normally distributed (age, education, body mass index, hemoglobin, serum and RBC folate and serum zinc). Mann Whitney U test for continuous variables that are non-normally distributed (number of pregnancy, serum ferritin, Hcy, vitamin B-12). Chi-square test for categorical variables.

### Association between micronutrient status and symptoms of depression at baseline

Women with and without depression did not differ in terms of any of the biochemical measures expressed as continuous variables (Table 2). Adjustment for age, education, marital status, morbidity scores, number of pregnancies and SES did not change the results. However, when micronutrient concentrations were divided into tertiles, depression was more common among participants in the lower tertile of RBC folate compared to the highest (Table 3). In the univariate analysis (Model 1), depression was 1.73 (95% CI: 1.02, 2.91) times more likely among women whose RBC folate concentrations were in the lowest tertile than among those with RBC folate concentrations in the highest tertile. Similarly, depression was also more likely among those in the lowest tertile of serum folate than among those in the middle tertile but this association was not significant (OR=1.43; 95% CI: 0.86, 2.39). In the multivariate analysis for RBC folate adjusted for age, marital status, morbidity scores, number of pregnancies, SES and education (Model 2), the odds were similar to those in the unadjusted model but no longer statistically significant (OR=1.71; 95% CI: 0.91, 3.18). No significant associations were found in any of the multivariate models between symptoms of depression and serum folate, Hcy, vitamin B-12, serum ferritin or serum zinc. Lower education and poorer morbidity scores, but not marital status, number of pregnancies or SES, were significantly associated with depression in multivariate models.

### Effects of micronutrient supplementation on symptoms of depression

Selected baseline characteristics including age, education, anthropometric measurements, marital or SES status, dietary intakes and biochemical indicators were not significantly different across the four treatment groups, as shown in Table 4 (43).

Table 4 also shows the CES-D scores and the proportion of women with depression pre- and post-supplementation. The mean baseline score was  $17.0 \pm 8.5$ , with no significant differences among the four treatment groups ( $p = 0.53$ ). At the end of supplementation, depression scores were reduced significantly within groups in all 4 group ( $p < 0.001$ ), but the changes did not differ among the groups ( $p = 0.95$ ). Overall, mean depression scores decreased by 2.3 points (95% CI -3.1, -1.4). At baseline, 49.3% of women were depressed; this was reduced to 37.7% after supplementation, with no significant differences in the extent of improvement across groups ( $p = 0.64$ ).

TABLE 3  
Odds ratios for having depressive disorders at different levels of RBC folate in logistic regression models

	Model 1 <sup>1</sup>			Model 2 <sup>2</sup>		
	OR	95% CI	CI	OR	95% CI	CI
RBC folate <sup>3</sup>						
Tertile 1 vs. 3	1.73	1.02	2.91	1.71	0.91	3.18
Tertile 2 vs. 3	1.11	0.86	1.87	1.32	0.71	2.43
Serum folate <sup>4</sup>						
Tertile 1 vs. 3	1.43	0.86	2.39			
Tertile 2 vs. 3	1.04	0.62	1.73			
Homocysteine <sup>5</sup>						
Tertile 1 vs. 3	0.90	0.54	1.50			
Tertile 2 vs. 3	0.71	0.43	1.79			
Vitamin B-12 <sup>6</sup>						
Tertile 1 vs. 3	0.74	0.44	1.25			
Tertile 2 vs. 3	0.90	0.53	1.52			
Serum ferritin <sup>7</sup>						
Tertile 1 vs. 3	0.81	0.45	1.34			
Tertile 2 vs. 3	0.95	0.58	1.57			
Serum zinc <sup>8</sup>						
Tertile 1 vs. 3	1.35	0.82	2.24			
Tertile 2 vs. 3	0.63	0.38	1.05			
Age				1.0	0.97	1.05
Education <sup>9</sup>						
Elementary vs. high school				2.63	1.19	5.82
Middle vs. high school				1.97	0.92	4.24
Single /divorced/ widowed				0.95	0.31	2.88
Morbidity tertile						
Low vs. high				2.59	1.37	4.90
Middle vs. high				2.40	1.31	4.38
Number of pregnancies =3				0.71	0.34	1.49
Socio-economic status						
Low vs. high				0.79	0.42	1.51
Middle vs. high				1.24	0.68	2.26

<sup>1</sup>Model 1 is unadjusted

<sup>2</sup>Model 2 controls for age, marital status, morbidity scores, number of pregnancies, SES and education

<sup>3</sup>Tertile of RBC folate: low: 101.6-354.6 nmol/L; middle: 354.7-480.3 nmol/L; high 480.4-1107.9 nmol/L

<sup>4</sup>Tertile of serum folate: low: 4.1-27.4 nmol/L; middle: 27.5-38.8 nmol/L; high 38.9-58.0 nmol/L

<sup>5</sup>Tertile of Hcy: low: 2.7-7.2  $\mu$ mol/L; middle: 7.3-9.3  $\mu$ mol/L; high 9.4-28.4  $\mu$ mol/L

<sup>6</sup>Tertile of vitamin B-12: low: 37.3-233.5 pmol/L; middle: 233.6-436.0 pmol/L; high 436.1-2660.0 pmol/L

<sup>7</sup>Tertile of ferritin: low: 2.0-32.7  $\mu$ mol/L; middle: 32.8-72.1  $\mu$ mol/L; high 72.2-408  $\mu$ mol/L

<sup>8</sup>Tertile of serum zinc: low: 31.7-62.3  $\mu$ g/dL; middle: 62.4-73.6  $\mu$ g/dL; high 73.7-116.9  $\mu$ g/dL

<sup>9</sup>Education is categorized as elementary school (less than 6 y schooling), middle school (6-9 y) and high school (= 10 y). SES status and morbidity scores was defined as high, middle or low based on tertiles. Education, SES and morbidity were each expressed as two dummy variables that left "high" as the reference category: low (low = 1, otherwise 0) and middle (middle=1, otherwise 0).

TABLE 4  
Changes in presence of symptoms of depression by treatment group

Treatment groups	Baseline <sup>1</sup>	Week 12 <sup>1</sup>	Difference <sup>2</sup>
Mean of depression score			
Overall (n=369)	17.0 (16.2, 17.9)	14.8 (13.9, 15.7)	-2.3 (-3.1, -1.4)
Group 1 (n= 88)	16.6 (14.8, 18.4)	14.3 (12.5, 16.1) <sup>3</sup>	-2.3 (-4.0, -0.6) <sup>4</sup>
Group 2 (n= 97)	16.4 (14.7, 18.1)	13.9 (12.2, 15.7) <sup>3</sup>	-2.4 (-4.1, -0.8)
Group 3 (n= 84)	17.2 (15.4, 19.0)	15.4 ( 13.5, 17.2) <sup>3</sup>	-1.8 (-3.6, -0.1)
Group 4 (n= 100)	18.0 (16.4, 19.7)	15.5 (13.8, 17.2) <sup>3</sup>	-2.5 (-4.1, -0.9)
CES-D score = 16			
Overall (n=369)	182 (49.3)	137 (37.7) <sup>3</sup>	-11.8 (-19.0 -0.1)
Group 1 (n= 88)	41 (46.6)	30 (35.3)	-11.3 (-26.0, 3.4) <sup>4</sup>
Group 2 (n= 97)	45 (46.4)	32 (33.3)	-13.1 (-27.0, 0.9)
Group 3 (n= 84)	47 (56.0)	32 (39.0) <sup>3</sup>	-16.9 (-32.0, -1.9)
Group 4 (n= 100)	49 (49.0)	43 (43.0)	-6.0 (-19.7, 7.7)

<sup>1</sup>Data are presented as least square mean (95% confidence interval) or n (%)

<sup>2</sup>Difference in depression score or percentage of subject with CES-D score  $\geq 16$

<sup>3</sup>Significant difference from baseline

<sup>4</sup>No significant differences across 4 groups

There was a negative correlation between reduction of symptoms of depression and baseline CES-D scores ( $r = -0.47$ ,  $p < 0.001$ ). Women with high initial depression scores (CES-D = 16) showed significant improvement with a mean decrease of 5.4 points (95% CI: -6.7, -4.1), while the change in women with low depression scores was not statistically significant (0.7 points; 95% CI: -0.1, 1.58).

### Sensitivity analyses

Analyses using a modified 18-item scale and a cut-off point of = 24 showed an improvement in all four groups (results not shown). The level of depression decreased from 14.1 to 8.8 (95% CI: -9.8, -0.6) from baseline to 12 weeks and the average difference in mean scores was -2.3 (95% CI: -3.1, -1.5). The comparison between tertile 1 vs. 3 (model 1) of the baseline distribution of RBC folate suggested a doubling of the risk of depression (OR = 2.10, 95% CI 0.93, 4.74); the corresponding comparison between tertile 2 vs. 3 suggested a slightly stronger relationship (OR = 2.48, 95% CI 1.12, 5.52).

## DISCUSSION

To our knowledge this is the first RCT to examine effects of micronutrient supplements on depression in women from developing countries. Nearly half of the women in our study had high levels of symptoms of depression (49.3%), a finding consistent with two other studies among women in rural Mexico (57,58). Because of possible cultural bias, the extent of depression defined using clinical criteria may differ and our population estimates need to be interpreted with caution. We found that women in the lowest RBC folate tertile had a

significant risk of depression 1.7 times greater than that of women in the highest tertile of RBC folate; this relationship disappeared after adjustment for potentially confounding factors although the magnitude remained unchanged. Contrary to some reports in the literature, no associations with depression were found for serum folate, Hcy, vitamin B-12, serum ferritin or serum zinc. RBC folate is a better, more stable "longer term" indicator of folate status than serum folate because the latter fluctuates with recent folate intake; this may explain the suggestion from our study of an association between RBC folate but not serum folate and depression. Additionally, discrepancies among studies may be due to the differences in study populations and in the instruments used to assess symptoms of depression.

The current study explored the efficacy of weekly versus daily FA plus other micronutrients on micronutrient status as well as depression. RBC folate measures were unavailable for the endpoint, but measures of change were available for serum folate and Hcy. The findings indicate that folate status was similarly improved by all four combinations of daily and weekly micronutrients, as reported elsewhere (43). The overall mean of serum folate concentrations increased by 15.4 nmol/L (95% CI: 13.8, 16.9), and the overall geometric mean of Hcy levels decreased by 9.8% (95% CI: -12.3, -7.1). There were differences in impact between weekly and daily supplementation for B-12 and ferritin levels. Daily supplementation improved serum B-12 by 20% (95% CI: 8, 33.2) while weekly supplementation had no significant impact (43). Changes in serum ferritin were significantly higher for daily compared to weekly supplemented groups [31.7  $\mu$ g/L (95% CI: 26.8, 36.6) vs. 7.6  $\mu$ g/L (95% CI: 2.8, 12.4)]. No

differences in Hb or serum zinc were found post-supplementation (59). A recent study by Rosenthal et al (60) is consistent with our results that weekly is as efficacious as daily FA supplementation in improving folate status. In a two-arm randomized clinical trial conducted in Honduran women, both daily and weekly FA supplementation significantly increased serum and RBC folate levels but supplementation with a daily dose of 1000 µg led to a larger and more rapid increase in both serum and RBC folate levels from baseline to endpoint than weekly supplementation with 5000 µg (60).

Our study was a well-conducted RCT in a community sample of women of reproductive age in a developing country, where the extent of micronutrient deficiencies is high. Implementation of the study was careful and rigorous, from the training of the interview team to the supervision of the supplementation, to ensure high-quality data. Our study had two weekly and two daily supplement regimens and, compared to baseline measures, all four groups improved equally in folate status (43). As shown in Table 4, all four groups also showed similar levels of improvement in depression scores. The overall mean of the depression scores decreased by 2.3 points and the prevalence of depression had significantly reduced from 49.3% to 37.7%. Thus, one interpretation of our findings is that improvements in folate status, which were similar in all four groups, caused improvements in depression of an equal magnitude across all groups.

However, our study has important limitations and other explanations are possible. Without a placebo control group, we cannot be certain that the improvement in symptoms of depression was due solely to the supplementation. We cannot exclude the possibility, however unlikely, that factors affecting depression improved in the community coincidentally with the beginning of supplementation. Also, without a placebo group, we cannot exclude the possibility of bias created by asking about the presence of symptoms of depression twice, at the beginning and end of the study. Specifically, we do not know whether familiarity with the CES-D instrument altered responses at the end of supplementation 12 weeks later. Finally, we cannot exclude a possible beneficial effect on symptoms of depression produced by the interaction between our research personnel and the study women over the course of the study. Future studies should consider including a placebo group.

Even if supplementation caused the improvements in depression, our study would not be able to attribute this unequivocally to FA because the supplements also contained other micronutrients. Zinc would be an unlikely cause because the improvement in symptoms of depression was similar in the groups with or without zinc. The role of iron is unclear. While changes in ferritin levels were greater in daily versus weekly groups, depression improved similarly across all groups; also, hemoglobin levels were not impacted by supplementation in any group (59). B-12 levels improved only

in those receiving daily supplementation making B-12 an unlikely explanation. Thus, the most likely mechanism for an effect due to supplementation is the improvement in folate status that was similar in all four groups, suggesting that all four groups provided doses that met the physiological need for folate. The possible role of folate is supported by the association between low RBC folate levels at baseline and depression and by the lack of such associations with the other micronutrients. Sensitivity analyses using a modified 18-item scale and a stricter definition of depression ( $\geq 24$ ) showed qualitatively similar results as those obtained using the original 20-item scale and the commonly used cut-off point of  $\geq 16$ .

In conclusion, weekly supplementation with FA plus other micronutrients was apparently equally effective as daily supplementation in improving folate status and may explain the improvement in symptoms of depression in Guatemalan women of reproductive age. Because a placebo control was not included, the possibility that factors other than supplementation caused these improvements cannot be excluded. Further studies are needed to isolate the specific impact of FA on depression.

#### ACKNOWLEDGMENT

We would like to express our sincere thanks to Dr. Luis Ramirez and Dr. Manuel Ramirez of INCAP for technical support, Vilma Gonzalez for coordination of the field work, the field workers who collected the data, and the women of the village of Concepcion, for their participation in the study.

#### REFERENCES

1. Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol.* 2005;19:59-65.
2. Murray CJL, Lopez AD. Global Burden of Disease: A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Vol. 1 of *The Global Burden of Disease and Injury*: Cambridge, Mass: Harvard School of Public Health; 1996.
3. Beck CT. The effects of postpartum depression on child development: a meta-analysis. *Arch Psychiatr Nurs.* 1998;12:12-20.
4. Orr ST, Miller CA. Maternal depressive symptoms and the risk of poor pregnancy outcome. Review of the literature and preliminary findings. *Epidemiol Rev.* 1995;17:165-71.
5. Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr.* 2003;23:41-58.
6. Corwin EJ, Murray-Kolb LE, Beard JL. Low hemoglobin level is a risk factor for postpartum depression. *J Nutr.* 2003;133:4139-42.
7. Beard JL, Hendricks MK, Perez EM, Murray-Kolb LE, Berg A, Vernon-Feagans L, et al. Maternal iron deficiency anemia affects postpartum emotions and cognition. *J Nutr.* 2005;135:267-72.

8. Wojcik J, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M, Grabowska M, Marcinek A, Florek E, et al. Antepartum/postpartum depressive symptoms and serum zinc and magnesium levels. *Pharmacol Rep.* 2006;58:571-6.
9. Maes M, D'Haese PC, Scharpe S, D'Hondt P, Cosyns P, De Broe ME. Hypozincemia in depression. *J Affect Disord.* 1994;31:135-40.
10. McLoughlin IJ, Hodge JS. Zinc in depressive disorder. *Acta Psychiatr Scand.* 1990;82:451-3.
11. Katz RL, Keen CL, Litt IF, Hurley LS, Kellams-Harrison KM, Glader LJ. Zinc deficiency in anorexia nervosa. *J Adolesc Health Care.* 1987;8:400-6.
12. Su JC, Birmingham CL. Zinc supplementation in the treatment of anorexia nervosa. *Eat Weight Disord.* 2002;7:20-2.
13. Abou-Saleh MT, Coppen A. Serum and red blood cell folate in depression. *Acta Psychiatr Scand.* 1989;80:78-82.
14. Bottiglieri T, Hyland K, Laundry M, Godfrey P, Carney MW, Toone BK, et al. Folate deficiency, bipterin and monoamine metabolism in depression. *Psychol Med.* 1992;22:871-6.
15. Fava M, Borus JS, Alpert JE, Nierenberg AA, Rosenbaum JF, Bottiglieri T. Folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder. *Am J Psychiatry.* 1997;154:426-8.
16. Papakostas GI, Petersen T, Mischoulon D, Ryan JL, Nierenberg AA, Bottiglieri T, et al. Serum folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder, Part 1: predictors of clinical response in fluoxetine-resistant depression. *J Clin Psychiatry.* 2004;65:1090-5.
17. Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Yoon JS. Predictive value of folate, vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression. *Br J Psychiatry.* 2008;192:268-74.
18. Morris MS, Fava M, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Depression and folate status in the US Population. *Psychother Psychosom.* 2003;72:80-7.
19. Ramos MI, Allen LH, Haan MN, Green R, Miller JW. Plasma folate concentrations are associated with depressive symptoms in elderly Latina women despite folic acid fortification. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1024-8.
20. Sachdev PS, Parslow RA, Lux O, Salonikas C, Wen W, Naidoo D, Christensen H, Jorm AF. Relationship of homocysteine, folic acid and vitamin B12 with depression in a middle-aged community sample. *Psychol Med.* 2005;35:529-38.
21. Dimopoulos N, Piperi C, Salonicioti A, Psarra V, Gazi F, Papadimitriou A, Lea RW, Kalofoutis A. Correlation of folate, vitamin B12 and homocysteine plasma levels with depression in an elderly Greek population. *Clin Biochem.* 2007;40:604-8.
22. Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry.* 2002;159:2099-101.
23. Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C = T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry.* 2003;60:618-26.
24. Penninx BW, Guralnik JM, Ferrucci L, Fried LP, Allen RH, Stabler SP. Vitamin B (12) deficiency and depression in physically disabled older women: epidemiologic evidence from the Women's Health and Aging Study. *Am J Psychiatry.* 2000;157:715-21.
25. Tolmunen T, Hintikka J, Ruusunen A, Voutilainen S, Tanskanen A, Valkonen VP, Viinamaki H, Kaplan GA, Salonen JT. Dietary folate and the risk of depression in Finnish middle-aged men. A prospective follow-up study. *Psychother Psychosom.* 2004;73:334-9.
26. Murakami K, Mizoue T, Sasaki S, Ohta M, Sato M, Matsushita Y, Mishima N. Dietary intake of folate, other B vitamins, and omega-3 polyunsaturated fatty acids in relation to depressive symptoms in Japanese adults. *Nutrition.* 2008; 24(2):140-7.
27. Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Yokoyama T, Ohya Y, Fukushima W, Saito K, Ohfuji S, Kiyohara C, Hirota Y. Dietary folate and vitamins B12, B6, and B2 intake and the risk of postpartum depression in Japan: the Osaka Maternal and Child Health Study. *J Affect Disord.* 2006;96:133-8.
28. Tolmunen T, Hintikka J, Voutilainen S, Ruusunen A, Alfthan G, Nyyssonen K, Viinamaki H, Kaplan GA, Salonen JT. Association between depressive symptoms and serum concentrations of homocysteine in men: a population study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1574-8.
29. Coppen A, Bailey J. Enhancement of the antidepressant action of fluoxetine by folic acid: a randomised, placebo controlled trial. *J Affect Disord.* 2000;60:121-30.
30. Coppen A, Chaudhry S, Swade C. Folic acid enhances lithium prophylaxis. *J Affect Disord.* 1986;10:9-13.
31. Godfrey PS, Toone BK, Carney MW, Flynn TG, Bottiglieri T, Laundry M, Chanarin I, Reynolds EH. Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet.* 1990;336(8712):392-5.
32. Passeri M, Cucinotta D, Abate G, Senin U, Ventura A, Stramba Badiale M, Diana R, La Greca P, Le Grazie C. Oral 5'-methyltetrahydrofolic acid in senile organic mental disorders with depression: results of a double-blind multicenter study. *Aging (Milano).* 1993;5:63-71.
33. Williams E, Stewart-Knox B, Bradbury I, Rowland I, Pentieva K, Helander A, McNulty H. Effect of folic acid supplementation on mood and serotonin response in healthy males. *Br J Nutr.* 2005;94:602-8.
34. Baldewicz TT, Goodkin K, Blaney NT, Shor-Posner G, Kumar M, Wilkie FL, Baum MK, Eisdorfer C. Cobalamin level is related to self-reported and clinically rated mood and to syndromal depression in bereaved HIV-1(+) and HIV-1(-) homosexual men. *J Psychosom Res.* 2000;48:177-85.
35. Bryan J, Calvaresi E, Hughes D. Short-term folate, vitamin B-12 or vitamin B-6 supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various ages. *J Nutr.* 2002;132:1345-56.
36. Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005;29:1103-12.
37. Marini A, Gragnolati M. Malnutrition and Poverty in Guatemala Technical Paper No. 6. World Bank.; 2003.
38. Sandstrom B, Sandberg AS. Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1992;6:99-103.
39. Fitzgerald SL, Gibson RS, Quan de Serrano J, Portocarrero L, Vasquez A, de Zepeda E, Lopez-Palacios CY, Thompson LU, Stephen AM, Solomons NW. Trace element intakes and dietary phytate/Zn and Ca x phytate/Zn millimolar ratios of

- periurban Guatemalan women during the third trimester of pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:195-201.
40. Casterline JE, Allen LH, Ruel MT. Vitamin B-12 deficiency is very prevalent in lactating Guatemalan women and their infants at three months postpartum. *J Nutr.* 1997;127:1966-72.
  41. Cifuentes G. Perfil epidemiológico de las anomalías del tubo neural en Guatemala, Enero-Diciembre de 2000 [Undergraduate Graduation Thesis]: School of Medicine. Universidad San Carlos de Guatemala; 2002.
  42. Acevedo CR, Anzueto ER, Mendez AG, Ramirez FM. Prevalencia de anomalías congénitas mayores externas, en recién nacidos atendidos en hospitales nacionales y regionales de Guatemala. (Durante el periodo comprendido del año 2001 al 2003) [Undergraduate Graduation Thesis]: School of Medicine. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala; 2004.
  43. Nguyen P, Grajeda R, Melgar P, Marcinkevage J, Flores R, Martorell R. Weekly may be as efficacious as daily folic acid supplementation in improving folate status and lowering serum homocysteine concentrations in guatemalan women. *J Nutr.* 2008;138:1491-8.
  44. Radloff LS. The CES-D Scale: A self-report depression scale for research in the general population. *Applied Psychological Measurement.* 1977;1:385-401.
  45. Soler J, Perez-Sola V, Puigdemont D, Perez-Blanco J, Figueres M, Alvarez E. [Validation study of the Center for Epidemiological Studies-Depression of a Spanish population of patients with affective disorders]. *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines.* 1997;25:243-9.
  46. Masten WG, Caldwell-Colbert AT, Alcalá SJ, Mijares BE. Reliability and validity of the Center for Epidemiology Studies Depression Scale. *Hispanic Journal of Behavioral Sciences.* 1986;8:77-84.
  47. Tamura T, editor. *Microbiological assay of folates in Folic acid metabolism in health and disease.* New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1990.
  48. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr.* 1987;422:43-52.
  49. CDC. US Department of Health and Human Services CDC. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication (CDC) 93-8395, Section II, 1999. p. 8-16.
  50. Perkin Elmer Instruments U. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry;* 2000. p.160.
  51. Rodríguez MM, Mendez H, Torun B, Schroeder D, Stein AD. Validation of a semi-quantitative food-frequency questionnaire for use among adults in Guatemala. *Public Health Nutr.* 2002;5:691-9.
  52. Maluccio J, Murphy A, Yount K. Research note: A socioeconomic index for the INCAP longitudinal study 1969-77. *Food Nutr Bull.* 2005;26:S120-4.
  53. Kung-Yee L, Scott L, Zeger. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika.* 1986;73:13-22.
  54. Stanford Patient Education Research Center. Spanish Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D). <http://patienteducation.stanford.edu/research/cesdesp.html>.
  55. Chiu S, Webber MP, Zeig-Owens R, Gustave J, Lee R, Kelly KJ, et al. Validation of the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale in screening for major depressive disorder among retired firefighters exposed to the World Trade Center disaster. *J Affect Disord;* 2009.
  56. Harlow BL, Cohen LS, Otto MW, Spiegelman D, Cramer DW. Prevalence and predictors of depressive symptoms in older premenopausal women: the Harvard Study of Moods and Cycles. *Arch Gen Psychiatry.* 1999;56(5):418-24.
  57. Fleischer NL, Fernald LC, Hubbard AE. Depressive symptoms in low-income women in rural Mexico. *Epidemiology.* 2007;18:678-85.
  58. Peralta-Pedrero ML, Mercado-Castelazo E, Cruz-Avelar A, Sanchez-Marquez O, Lemus-Rocha R, Martinez-Garcia M del C. [Depression prevalence and risk factors found in women attended by a family physician]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social.* 2006;44:409-14.
  59. Nguyen PH. The effects of daily versus weekly folic acid supplementation on biochemical and functional status of reproductive age women in rural Guatemala. A doctoral thesis submitted to the Graduate School of Art and Sciences: Emory University; 2008.
  60. Rosenthal J, Milla G, Flores A, Yon M, Pfeiffer C, Umana E, Skerrette N, Barahona F. Effect of different dosage and administration schedules of folic acid on blood folate levels in a population of Honduran women of reproductive age. *Public Health Nutr.* 2008;11:822-30.

Recibido: 27-04-2009

Aceptado: 27-07-2009

## Comparing the impact of chronic energy restriction and vitamin E supplementation on the behavior of adult rats

*Derlange B. Diniz, Suzana L. de Oliveira, Liana L. Melo, Jaime Amaya-Farfan*

Food Security and Nutrition Laboratory, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, Faculty of Nutrition, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil, University of São Francisco/Bragança Paulista, SP, Brazil, Department of Food and Nutrition, University of Campinas - Unicamp, Brazil

**SUMMARY.** The purpose of this work was to investigate the influence of energy restriction and vitamin E supplementation on memory, learning, anxiety and spontaneous locomotion in adult rats. Three-month old male Wistar rats were grouped according to diet: Control (AIN 93-M; n=18), Supplemented (AIN 93-M + 1425 IU all-*rac*- $\alpha$ -tocopheryl acetate/kg diet; n=22) and Restricted (AIN 93-M with 30% reduction in carbohydrate energy; n=23). Sixteen weeks after, the passive avoidance (PA), elevated plus-maze (EPM) and open field (OF) tests were applied. In the EPM test, the behavioral profile of the supplemented group was characterized by a lower frequency of entries into the open arms ( $P < 0,026$ ), whereas the restricted group showed a lower frequency of head dipping ( $P < 0,003$ ). The ratio between the time span of the shocks and the number of attempts were larger for the supplemented than for the non-supplemented animals ( $P = 0,0474$ ), thus suggesting a delay in learning in the PA test. Taken together, these results suggest that a long-term combination of carbohydrate energy restriction in rats should not cause negative behavioral alterations. Compared with vitamin E supplementation, the restricted diet performed equally or better in rats as an alternate antioxidant diet.

**Key words:** Diet composition, behavior, energy restriction, vitamin E supplementation, antioxidant diet.

**RESUMEN. Comparación del impacto entre la restricción energética crónica y la suplementación con vitamina E en el comportamiento de ratas adultas.** Se investigó la influencia de la restricción energética en comparación a la suplementación con vitamina E en la memoria, aprendizaje, ansiedad y locomoción espontánea en ratas adultas. Machos Wistar de tres meses de edad fueron agrupados de acuerdo a las dietas: Control (AIN 93-M, n=18), Suplementados (AIN 93-M + 1425 UI all-*rac*- $\alpha$ -tocoferil acetato / kg de dieta; n=22) y Restrictos (AIN 93-M con 30% de restricción energética en los carbohidratos; n=23). Dieciséis semanas después, fueron aplicadas las pruebas de esquivas pasiva (PA), laberinto elevado en cruz (EPM) y de campo abierto (OF). En la prueba de EPM, el grupo suplementado mostró una menor frecuencia de entradas en los corredores abiertos ( $P < 0,026$ ), mientras el grupo restricto registró menor frecuencia de bajadas de cabeza ( $P = 0,003$ ). La razón entre la duración de los choques y el número de intentos fue superior para el grupo suplementado, que para los no suplementados ( $P = 0,0474$ ), lo cual sugiere un leve perjuicio en el aprendizaje de los suplementados, según la prueba de PA. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la restricción crónica en energía de carbohidratos no provoca alteraciones negativas en el comportamiento de ratas adultas y que sus beneficios pueden superar los obtenidos al suplementar la dieta patrón con vitamina E, como opción de dieta antioxidante.

**Palabras clave:** Dieta, comportamiento, restricción energética, suplementación con vitamina E, dieta antioxidante.

### INTRODUCTION

The impact of the modern environment on well-being, including the diet, is a main concern of health authorities throughout the world. Special emphasis has been placed on the use of antioxidants, whether as part of the diet or in the form of supplements in order to minimize the impact of environmental factors on the general state of health. While no official reference intakes on the vast list of antioxidants have been issued, and as more antioxidants, both synthetic and natural, become available in the market, conscious consumers may prefer to adopt one of several forms of food restriction, among which carbohydrate energy restriction has met some success in the past, as an option to provide themselves with a share of antioxidant benefits.

Energy restriction has been recognized as one of the most consistent dietary manipulations to delay aging in mammals (1-3). Some researchers have focused on the benefits of this practice on the physical performance, learning and information retrieval capacity of old rats (4-6), the learning capacity of young rats (7) and on behavioral tests using experimental models for degenerative diseases (8,9). On the other hand, potentially harmful effects of energy restriction on brain development, such as the effect of protein-energy deficits on cognitive and motor performance in young animals, have also been pointed out (10-13). Although the beneficial effects attributed to energy restriction depend on the adequacy level of all the essential nutrients supplied by the diet and, therefore, defining the diet composition may be of fundamental

importance to the experimental design (7), this issue has been poorly addressed.

The health properties of vitamin E have been extensively recognized, including inhibition of smooth-muscle cell proliferation, preservation of endothelial function, inhibition of monocyte-endothelial cell adhesion, inhibition of monocyte reactive oxygen species and cytokine release, and inhibition of platelet adhesion and aggregation. These cellular responses to  $\alpha$ -tocopherol are associated with transcriptional and post-transcriptional events. Activation of diacylglycerol kinase and protein phosphatase 2A, and the inhibition of protein kinase C, cyclooxygenase, lipoxygenase, tyrosine kinase 2-phosphorylation, and cytokine release by  $\alpha$ -tocopherol are all examples of post-transcriptional regulation that explain the vitamin's antioxidant actions in the body (14), while its consumption as an antioxidant supplement gains acceptance owing to its very low toxicity (15).

The brain contains high levels of unsaturated lipids and is responsible for 20 to 25% of the body's oxygen consumption, under conditions that favor the occurrence of oxidative stress. Quantitatively, vitamin E is the predominant encephalic lipophilic antioxidant, whose main function is to protect brain lipids from oxidative damage (16). The physiological decline associated with aging, including psychomotor and cognitive disorders, is considered to be partly the result of an accumulation of molecular oxidative damage (17,18), and this process may be ameliorated by antioxidant therapies, over and above the general recommendation of a plethora of antioxidant foods.

Because the brain tissue is particularly susceptible to oxidative stress we have compared a diet protocol of carbohydrate energy restriction with vitamin E supplementation in Wistar rats and found that both can offer similar protection against oxidative damage to various tissues, except to the brain, where the restricted diet had a significantly better performance (19).

Despite the potential benefits attributed to the above mentioned diet models, the possible repercussions of such interventions for prolonged periods of time on adult animal behavior have not been thoroughly studied and should merit a comparative evaluation. Therefore, the objective of the present study was to examine the nutritional-behavioral relationship, specifically regarding the anxiety level, locomotion activity, learning and memory of adult rats submitted to chronic consumption of energy restricted, as compared to vitamin-E supplemented diets. For this purpose, the classical open field (OF), elevated-plus maze (EPM) and passive avoidance (PA) tests were used.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and diets

Sixty-three 21-day old male Wistar rats (Vivarium Center, University of Campinas, Brazil) were housed in collective

cages ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 12h light-dark cycles) and fed on commercial laboratory chow (Labina, Ralston-Purina do Brasil, Ltd., Campinas, Brazil) *ad libitum* for eight weeks. At three months of age, the animals were transferred to individual cages to start the experiment and randomly allocated to one of three diet groups. Group *C* (control;  $n=18$ ) had free access to the maintenance AIN 93-M diet (20), while group *S* (supplemented;  $n=22$ ) was fed diet *C ad libitum*, but with the addition of 1425 IU of vitamin E (all-*rac*- $\alpha$ -tocopherol acetate), and group *R* (restricted;  $n=23$ ) received a modified *C* diet at a lower amounts and with less carbohydrate, as detailed in Table 1. Initially, all groups underwent a one-week adaptation period consuming the control diet.

TABLE 1  
Composition of the three diets based on the recommendations of AIN 93-M\*

Ingredients	Diets (g/100g)		
	Control	Restricted	Supplemented
Corn starch (87,6%)	62.07	54.15	62.07
Sucrose (99,5%)	10.00	7.22	10.00
Soybean oil	4.00	5.71	4.00
Fiber (cellulose)	5.00	5.86	5.00
AIN-93 M mineral mixture <sup>?</sup>	3.50	5.00	3.50
AIN-93 M vitamin mixture <sup>†</sup>	1.00	1.43	1.00
L-cystine	0.18	0.26	0.18
Choline bitartrate	0.25	0.36	0.25
<i>Tert</i> -butylhydroquinone	0.0008	0.0011	0.0008
all- <i>rac</i> - $\alpha$ -tocopherol acetate (0.5 $\alpha$ -TE <sup>**</sup> )	—	—	0.285 <sup>**</sup>
Total energy (joules)	1454.82	1454.44	1454.82

\*Reeves et al. (20). <sup>?</sup>contains 20.98g sucrose/100g.

<sup>†</sup>contains 97.47g sucrose/100g.

\*\* $\alpha$ -TE:equivalents of  $\alpha$ -tocopherol; 1 $\alpha$ -TE=1 mg *d*- $\alpha$ -tocopherol.

<sup>\*\*</sup>sufficient to supply additional 1425IU/kg of diet (or a total of 1500 U/kg).

The restricted diet was formulated such that when offering 70% of the amount consumed by group *C*, the amounts delivered for all nutrients would be the same as for group *C*, with the exception of the carbohydrates. Consequently, by restricting diet consumption (or energy intake) to 70% of that of the controls, the *R* group was ingesting 40% less carbohydrate. Diet *S*, on the other hand, supplied twenty times the amount of vitamin E recommended for the rat (20). In order to keep a closer check on energy consumption, the total energy of the diets was determined using a Parr calorimeter, model 1261/1563 (Moline IL, USA).

The feeding trial was carried out for 16 weeks and the entire study was performed according to the Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the University of Campinas, Brazil. The amount of diet to be fed to the *R* group was determined from the daily average consumed by the *C* group. Body weight changes were monitored and recorded weekly.

### Behavioral tests

At the end of the 16th week, the effects of the diet on spontaneous motor activity, anxiety level, learning capacity and memory were measured by applying the open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and passive avoidance (PA) tests, respectively. The tests were conducted in that sequence throughout a period of two weeks, with intervals of three days between tests. Preceding every test, the freshly fed animals were allowed to stay in the testing environment for 10 minutes in order to remove the effects of the natural search for food or of inhibition due to a new environment. All procedures were manually and video recorded by the researcher from a location visually inaccessible to the subjects.

For the OF test, the instrument consisted of a transparent acrylic chamber (100x100x40cm) with 25 square plots drawn on the floor. The animal was initially placed in one of the corners and, during a 5-min observation period, peripheral and central crossings and rearing, self-washing and defecation activities were registered.

The EPM test was conducted in a roofless, Formica-coated wooden device, positioned 50cm above the laboratory floor and consisting of two open arms (50x10x1cm), with acrylic side walls (1cm), and two closed (50x10x40cm) arms. In order to start the test, the animals were placed at the center of the maze, facing one of the closed arms. Their behavior was observed and recorded for 5min. Standing times in the open and closed arms, self-washing routines, protected (head projected towards the closed arms or central platform) and unprotected (head projected towards open arms), head dipping, listening and both protected and unprotected cautious exploration attempts, were recorded.

The device for the PA test was a box (40x22x30cm) with a metal roof and walls and a floor with stainless steel bars (0.3 cm in diameter, spaced 1.2 cm from each other) connected to a low intensity (1mA) shock generator, to provoke an adverse reaction. A Formica platform (8 x 13 cm), hoisted on stilts, was placed inside the box to one side. The front of the box was of transparent acrylic material to allow for the researcher to see the animal and make a video recording. The test consisted of two phases: acquisition and retention. In the first phase the animal should remain on the platform where he was placed at the start of the test, avoiding the shocks for 200 sec, as a learning parameter. The number of descents (attempts), the time taken to descend from the platform (latency), and the time remaining on the metal bars (receiving shocks) were recorded. Animals remaining on the bars receiving shocks for more than 300 sec were eliminated from the experiment. The second phase, carried out 48 h later, tested retention of the acquired behavior, measuring the time required for the animal to descend from the platform and place his four paws on the bars, without shocks (maximum waiting period, 600 sec). In this phase the number of false descents from the platform was also measured (placing

the front paws on the bars and returning to the platform) and the number of rearing movements.

### Alpha-Tocopherol in brain tissue

This vitamin was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Sharma & Kumar (21), with modifications. The brain tissue was homogenized (50 g/L; 0.05M phosphate buffer, pH 7.4; 90  $\mu$ M butylhydroxytoluene -BHT) in an ice bucket, using a homogenizer with a Teflon pestle. 400  $\mu$ L of absolute ethanol were added to the brain homogenate and the mixture vortexed for 1 minute. After centrifugation (12,000 x g for 5 minutes), the tocopherol was recovered in methanol following extraction with *n*-hexane. Elution from the HPLC equipment (Varian, model 9012, equipped with a 9075 fluorescence detector) was monitored at 290 (excitation) and 330nm (emission). A standard calibration curve for ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol was used for quantification, and recorded per unit protein in the tissue. With a few exceptions, the alpha-tocopherol determinations were carried out in half of the animals of each group.

### Statistical analyses

The characteristics of normality of distribution of the data and homogeneity of the variances were analyzed using the tests of Lilliefors and Levene, respectively. Whenever applicable, monovariate ANOVA was performed and differences between groups detected by the tests of Snedecor and Tukey-HSD. When the criteria for parametric analysis were not met, the differences were evaluated by the Kruskal-Wallis test, adopting the Nemenyi test for multiple comparisons. A level of  $p \leq 0.05$  was selected to indicate minimum significance for all comparisons. The Statistica for Windows program (StatSoft Inc. Tulsa, OK/USA) was used for the statistical analyses.

## RESULTS

### Body weight and brain $\alpha$ -tocopherol levels

As expected, the mean weight gain of the restricted group at the end of the experimental period was significantly lower, or approximately 22% of the weight gained by the others (initial mean weights: C = 323.4  $\pm$  25; S = 329.8  $\pm$  28; R = 332.0  $\pm$  26g; final mean weights: C = 467.1  $\pm$  40; S = 473.6  $\pm$  52; R = 364.7  $\pm$  17g; maximal  $P < 0.001$  for changes). The respective final mean brain  $\alpha$ -tocopherol concentrations for the control, restricted and supplemented groups were 0.32  $\pm$  0.02, 0.28  $\pm$  0.03 and 0.47  $\pm$  0.05  $\mu$ g/ mg protein ( $P$  between S and the others  $< 0.0001$ ).

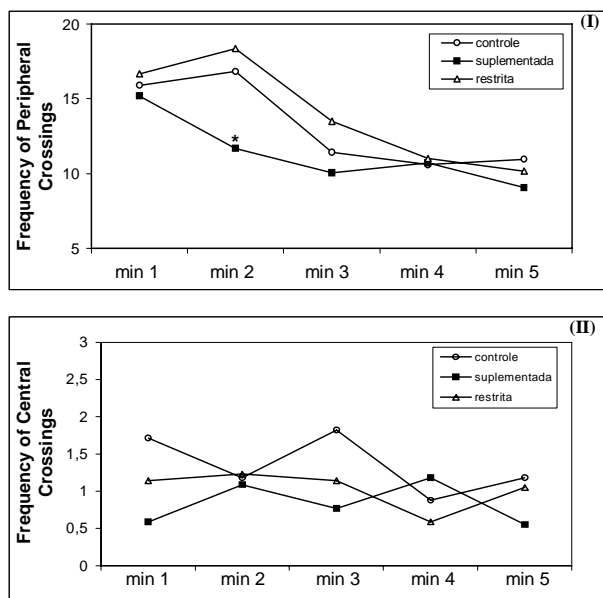
### Open Field

The standard Open Field test is commonly used to assess locomotor, exploratory and anxiety-like behavior in laboratory rats. This test is particularly useful in evaluating the

effects of anxiolytic and anxiogenic drugs, locomotor responses to drug and as well as behavioral responses to novelty.

The results shown in Figure 1 indicate no differences in general locomotion activity (central + peripheral crossings) between the supplemented and restricted animals when compared to the control group, or among themselves ( $F(2,58) = 1.35$ ;  $P = 0.2678$ ), after a five-minute period. Likewise, no alterations were detected in central roaming ( $F(2,58) = 1.01$ ;  $P = 0.3694$ ). Nevertheless, the vitamin-E supplemented group performed a significantly lower number of peripheral crossings during the second minute of the test, with respect to the other two diet groups ( $F(2,58) = 5.85$ ;  $P = 0.0048$ ). As time elapsed, however, differences between groups tended to disappear.

FIGURE 1



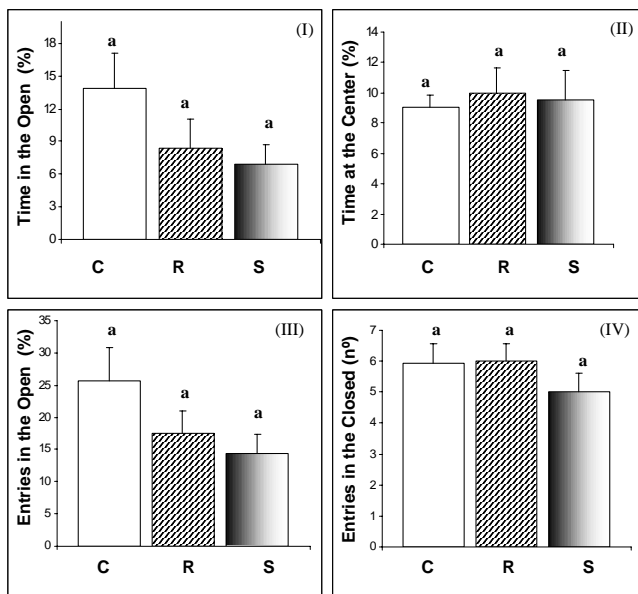
Peripheral (I) and Central (II) crossings in the Open Field Test. (Control diet,  $n = 17$ ; Vitamin-E supplemented diet,  $n = 22$ ; Restricted diet,  $n = 22$ ). Asterisk indicates  $P < 0.01$  in relation to the control. Values represent the mean and standard error of the mean.

There was also no difference between the groups regarding the total number of rearing attempts ( $C: 27.35 \pm 2.41$ ,  $R: 25.2 \pm 1.9$  and  $S: 22.1 \pm 2.22$ ;  $F(2,58) = 1.63$ ;  $P = 0.2047$ ) or self-washings ( $C: 0.35 \pm 0.19$ ,  $R: 0.36 \pm 0.28$  and  $S: 0.45 \pm 0.21$ ;  $H(2, N = 61) = 2.2414$   $P = 0.3261$ ), although the number of fecal droppings were significantly greater for the restricted group than for the other two diet groups ( $C: 1.18 \pm 0.32$ ,  $R: 3.09 \pm 0.46$  and  $S: 0.46 \pm 0.55$ ;  $H(2, N = 61) = 6.54$   $P = 0.0380$ ).

### Elevated-plus maze

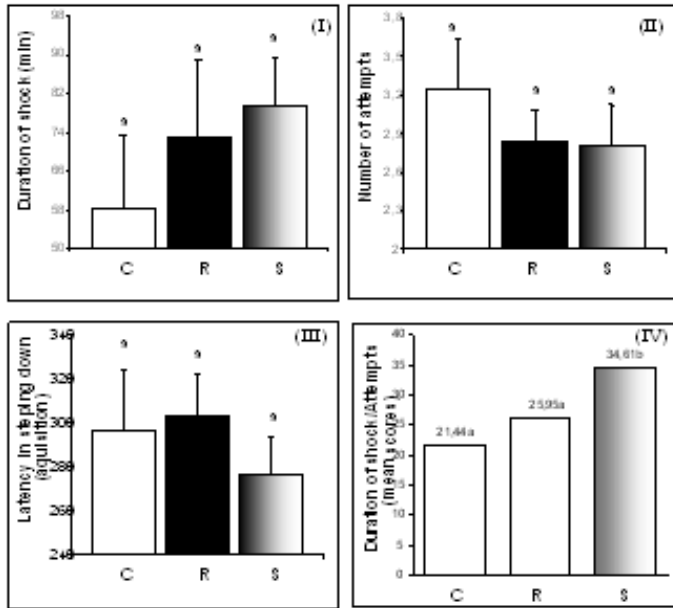
This test is used to assess the anxiety produced by any external or internal factor, such as drug, food or environmental perturbation and is based on the animal's preference for dark, closed, rather than bright, open spaces. Statistical analysis of the results of the EPM (Figure 2) indicated that the diets under evaluation produced no differences in the general parameters analyzed by this anxiety test. Nevertheless, excluding any zero-entry events (Figure 3), the analysis showed that animals of the supplemented group entered the open arms a lower number of times, in comparison to the controls ( $F(2,38) = 4.04$ ;  $P < 0.026$ ), suggesting they felt less confident when being in the open. A significantly lower number of head dips ( $C: 8.0 \pm 0.98$ ,  $R: 3.29 \pm 0.53$  and  $S: 6.64 \pm 1.34$ ;  $F(2,38) = 6.79$ ;  $P < 0.003$ ), and unprotected dips ( $C: 5.42 \pm 0.1$ ,  $R: 1.93 \pm 0.47$  and  $S: 3.14 \pm 0.88$ ;  $H(2,0 N = 41) = 7.48$ ;  $P = 0.02$ ) were also evident for the restricted group, as compared to the control. Head dipping is another indication of self confidence and desire to explore. With respect to listening activities (rearing movements) ( $C: 0.94 \pm 0.3$ ,  $R: 0.65 \pm 0.2$  and  $S: 0.59 \pm 0.2$ ) and cautious exploration ( $C: 2.06 \pm 0.6$ ,  $R: 1.39 \pm 0.3$  and  $S: 2.23 \pm 0.4$ ), no significant differences were found between the groups under study ( $P > 0.05$ ).

FIGURE 2



Time spent (%) in the Open Arms (I), at Center (II), Number of Entries in the Open (III) and in the Closed (IV) of the animals in diets (C, control,  $n = 17$ ; R, restricted,  $n = 23$ ; S, vitamin-E supplemented,  $n = 21$ ) in the Elevated-Plus Maze test. Values represent means and standard errors of the mean. Equal letters indicate no statistical difference between means ( $p > 0.05$ ).

FIGURE 3



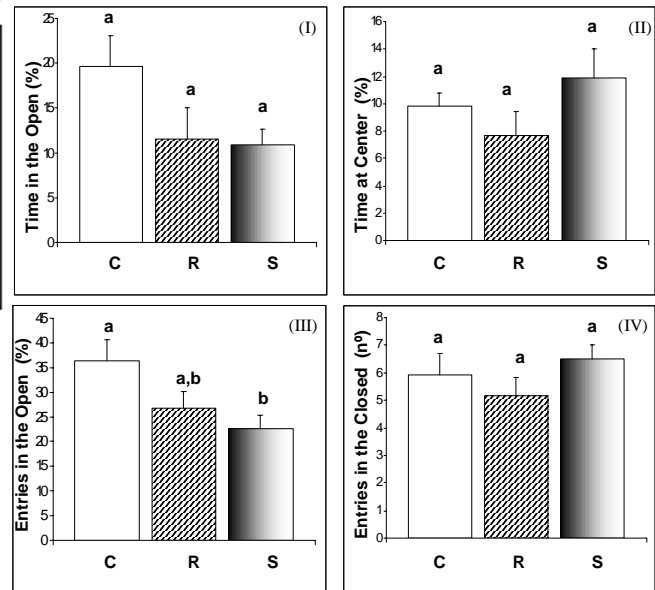
Time spent (%) in an Open Arm (I), at Center (II), Entries in the Open (III) and Entries in the Closed (IV) of animals in diets (C, control, n = 12; R, restricted, n = 15; S, vitamin-E supplemented, n = 14) in the Elevated-Plus Maze test. Animals that did not enter the Open Arms were excluded. Values represent means and standard errors of the mean. Equal letters indicate no statistical difference between means ( $p > 0.05$ ).

**Passive avoidance**

Passive-avoidance response (PAR) is extensively used for the screening of drugs affecting learning and memory. The test involves training rodents to avoid punishment (normally an electric shock) by curbing a normal behavior (such as the exploratory behavior). At specified intervals after training, the animals are tested again for retention of such learning. The conventional and the most widely employed parameters are step-down latency (SDL) and step-down errors (SDE). In order to test the consistency of the learned behavior, we introduced an extra parameter, namely, the total time spent by the animal in the shock zone (TSZ). The parameters of time-exposure to shock and number of attempts recorded during the avoidance response-acquiring phase (Figure 4) showed no difference between the groups when analyzed individually ( $F(2.57) = 0.43$ ;  $P = 0.6529$  and  $H(2, N = 60) = 0.88$ ;  $P = 0.6452$ , respectively). Since the means did not differ considerably, a new parameter was calculated by taking the ratio between the former two parameters (Figure 4-IV), and this time the ratios showed a significant difference between the supplemented and both control and restricted animals. One rat from the control group and another from the supplemented group were excluded during the first phase of the test for spend-

ing longer than 300 seconds on the bars, without acquiring the avoidance response. In the second phase of the test, no statistical difference was found between the different diet groups with respect to the time spent on the platform ( $H(2, N = 61) = 0.88$ ;  $P = 0.6441$ ), suggesting a similarity in the retention of the learned behavior. Alterations were also not detected with respect to rearing and false descent movements (SDE; Figure 5).

FIGURE 4

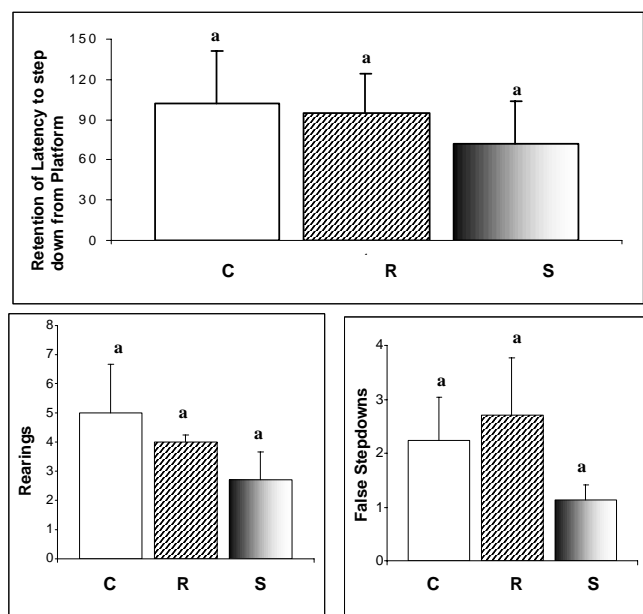


Passive Avoidance Response. Means and SEM of duration of shock (min) (I), Number of Attempts ( II ), Latency (min) to step down from platform (III) and ratio of duration of shock (min)/ attempts (IV) of animals in diets (C, control, n = 17; R, restricted, n = 23; S, vitamin-E supplemented, n = 21) in the Inhibitory Avoidance test. Values represent means and standard errors of the mean (I, II, III) or mean scores (IV). Equal letters indicate no statistical difference between means ( $p > 0.05$ ).

**DISCUSSION**

The majority of studies on the effect of diet on animal behavior have featured the repercussions of malnutrition and undernutrition on growth and development (11,13,22-25), while others have evaluated the effects of isolated nutritional factors, mainly regarding the benefic action on chronic diseases and aging (2,5,17,18,26-30). Meanwhile, other works have dealt with the influence of energy restriction on development and reproduction (7,8), as well as alternative antioxidant diets (17). This work sought to compare the impact of the chronic administration of two antioxidant dietary regimes, energy restriction (in both carbohydrate content and total energy intake restriction) and vitamin E supplementation on rat behavior.

FIGURE 5



Latency in stepping down from platform – Retention phase (I); Rearings (II) and false stepdowns (III) of animals in diets (C, control,  $n = 17$ ; R, restricted,  $n = 23$ ; S, vitamin-E supplemented,  $n = 21$ ) in the Inhibitory Avoidance test. Values represent means and standard errors of the mean. Equal letters indicate no statistical difference between means ( $p > 0.05$ ).

Upon confrontation of the results obtained in the open field test of the present study with those of the behavioral standard designed by Huston & Bures (31) for adult rats, the observed performance was similar to that described in the literature, with no differences in general activity found between the two diet models investigated. The supplemented animals, however, explored less the peripheral squares between the first and second minute of observation (Figure 1) and this could be somewhat relevant if we were to consider quick responses, but not if we consider the total time interval of the test, when no difference was found among the groups ( $C = 72.4 \pm 6$ ;  $R = 74.9 \pm 8$ ;  $S = 60.7 \pm 6$   $F(2,58) = 1.35$ ;  $P = 0.2678$ ). Since the control and the supplemented groups bore similar body weights and the controls showed a tendency to normal productive locomotion, the possibility that the supplemented animals were discouraged from any greater exploratory activity because of their weight had to be discarded. Therefore, it appears that supplementing the standard diet with extra doses of vitamin E may have resulted in a partial loss of exploratory desire of the animals so treated.

Similarly, McDonald et al. (17) did not observe significant improvement of the psychomotor performance of 24-month old mice fed antioxidant diets containing either vitamin E,

coenzyme Q or a mixture of both for 14 weeks. Interestingly, these authors did notice a moderate impairment in the performance at the initial phase of coordinated running, with either the vitamin alone or in combination with the coenzyme. Sumien et al. (32) in turn have reported deleterious effects in vitamin-E supplemented aged mice, yet not in young ones, when submitted to tests demanding coordination and fast responses, after a short-term supplementation with a dose similar to the one used in this work. Contrasting with our experiment, the supplementation by Sumien et al. (32) and McDonald et al. (17) started when the animals were at least 20 months old.

On the other hand, Shukitt-Hale et al. (30) reported beneficial effects of some antioxidant diets tested by the group, including age-related cognitive behavioral deficits and changes in neuronal signal transduction due to vitamin E supplementation. One of the diets tested was a blueberry based diet that reverted deficits in motor performance. In another study involving the administration of diets with various concentrations of vitamin E and C, plus selenium, fed to 12-month old mice for six months, Richwine et al. (18), also concluded that the diet containing high levels of antioxidants showed to be beneficial, considering that they improved the psychomotor coordination of the 18-month old animals in the rod walking test. The results of our study, therefore, should not necessarily agree with those discussed above for our objective was to assess the response of rats with clearly defined diets and without the intervention of complex mixtures of foods or the cocktail effect of multiple nutrient supplementation. It is still possible, however, that clear-cut beneficial behavioral effects of such antioxidant diets are somewhat age-related, being more evident at the onset of the psychomotor decline, rather than at an early age when target features of behavior can be overridden by either strong adaptive metabolic pathways of the young, or later on, by irreversible metabolic developments that have already been installed.

It is worth mentioning that apart from establishing the spontaneous activity pattern of the animal, the open field test can be used as a simple evaluation of the emotional state. It is known that changes in emotional state are accompanied by various vegetative phenomena, such as changes in the heart rate, voltaic response of the hair and dilatation of the pupils. In addition to these features, one can evaluate the autonomic defecation function, considering that animals that roam less and defecate more are referred to as being more emotionally affected than those with the opposite behavior (31).

Generally and under standard conditions, the behavior of adult rats shows a high negative correlation between defecation and exploration of the central squares. Although the restricted animals excreted a greater number of fecal droppings, it was surprising to find no correlation between this parameter and central roaming. Harrison & Archer (1)

used this test in various assays with mice and observed a greater activity in adult and elderly animals fed a restricted-energy diet, as compared to controls with free access to food. However, more recently, Wu and coworkers reported no detectable differences in the exploratory activity of mice after three (7) and six (8) months consuming diets with 20 and 35% food restriction, respectively. Therefore, it was not surprising to find only a loose correlation between the defecation parameter and the central roaming activity.

The elevated-plus maze is a classical test that measures the degree of anxiety of the animal as being directly proportional to the length of time it spends in the enclosed arms, or avoiding being exposed in the open. With regard to the behavioral features analyzed by the EPM, we observed that, as with the open field results, it was not possible to detect any differences in exploratory or other ethological performance of the adult animal between energy restriction and vitamin E supplementation during the 16-week period, indicating at first glance that neither of the antioxidant dietary models was likely to interfere with the anxiety levels of the animals by this criterion.

It is important to observe, however, that a considerable percentage of the animals, similar for all three groups, did not explore the open arms of the maze at all (C=30%, R= 35%, S=35%), thereby increasing the dispersion of the data in all groups. For this reason the data were further analyzed, this time excluding the non-responsive animals (Figure 3). Upon new analysis, the vitamin-E supplemented group showed a lower percentage of entries in the open arms when compared to the control, thus suggesting an anxiety response in this group, about 28% greater than in the control. The restricted group meanwhile, did not differ from the control. The reason why none of the groups showed a fuller responsiveness is not known. Reactive oxygen species have been critically implicated in various types of pain, including neuropathic and inflammatory pain, in which vitamin E seems to play an analgesic role (33). If this were the case, a slight attitude of indifference could have lowered the response to the test by these animals.

Rodgers & Cole (34), however, examined the behavioral response of mice in the EPM test soon after an experience of aggression, and demonstrated the importance of social stress factors in the production of analgesia. The anxiety response effect of social competition was partially reproduced in mice simply by exposing them to the smell of an aggressive male, producing a reduction in the total number of entries and rearing movements, and also in the percentage of entries into the open arms, as well as the time spent there. By establishing a parallel with the present study, and interpreting the prolonged isolation of the animals as a factor of stress (25), we should arrive at the opposite conclusion because the excess vitamin should confer an additional edge of relaxation to the supplemented group. Therefore, it seems reasonable to suspect that a

factor, other than solely analgesia, may have contributed to the lower number of entries of the supplemented rats in the open arms.

An analysis of the results obtained in some studies evaluating the learning capacity and memory of animals fed diets with different compositions showed that for the inhibitory passive avoidance the behavioral changes more likely to occur in undernourished animals were lower thresholds to the perception of shock, shorter avoidance latency and greater resistance to extinguishing the avoidance response (12,35).

Additionally, Goodrick et al. (36) asserted that once learned, the information remained available for an extensive period of time. These researchers observed a substantial retention of learning up to 45 days after the avoidance test was performed in Wistar rats, both young and old.

In general, undernutrition does not affect acquisition of the avoidance response, but animals in this condition normally require a greater number of attempts on the springboard and in the come-and-go box (12). In our experiment, results of the retention phase (performed 48h later) suggested that neither high levels of vitamin E supplementation or 30% energy restriction for the prolonged period of the study influenced memory recall of the adult rats because in all cases the acquired response was evidently retained.

Moreover, Socci et al. (5), upon administration of a combination of intra-peritoneal injections of phenyl- $\alpha$ -tert-butyl nitron (PBN; 32 mg/kg body weight) and  $\alpha$ -tocopherol (200 mg/kg body weight) for approximately 4 to 5 months, in 24 month-old rats, showed that the animals treated with antioxidants had a greater learning acquisition rate. In the experiment of McDonald et al. (17) the authors reported a beneficial effect on learning and memory consolidation of aged rats from feeding a combination of vitamin E and coenzyme Q, but this effect was not detected when the supplemental nutrients were administered individually. In such case, it was hypothesized that a synergic action could have contributed to the final antioxidant effect of the mixture.

In the passive avoidance test, one could think that the vitamin E supplement could have had some influence on the animals' performance because of an induced opioid-type analgesia. This mechanism has been little investigated, but there is evidence to this effect in studies published by Kryzhanovskii et al. (37,38) in the former Soviet Union, where an analgesic action was perceived when vitamin E was administered to women with dysmenorrhea.

The effect of 100 mg  $\alpha$ -tocopherol acetate, via intra-muscular injection, on reducing pain, was effective 15-20 minutes after application. When a dose of 500-600 mg was applied during two consecutive menstrual cycles, a residual effect of up to six months after administration was found. The authors showed evidence of a possible involvement of the endogenous opioid system in the analgesic effect induced, mo-

bilizing  $\beta$ -endorphin from the pituitary gland. The involvement of this system was confirmed by injecting naloxone – an antagonist of morphine receptors and endogenous opioid peptides. The analgesic effect of the repeated administration of  $\alpha$ -tocopherol has been also blocked after injecting naloxone (37,38). Direct evidence for this association, however, could be sought in future investigations.

In spite of all these considerations, it appears as though any possible handicap associated with the supplemented diet, in relation to energy restriction, may be of such complex nature that the present tests are not designed to determine if the vitamin's analgesic property is involved.

### CONCLUSION

By the application of three classical behavioral tests we can conclude that young adult rats submitted to a chronic (four month) carbohydrate-energy restricted diet, suffered no detectable alterations in their normal behavioral characteristics, as evaluated by locomotor activities and various manifestations of anxiety, in comparison to the group fed a standard diet *ad libitum*. The carbohydrate-energy restricted animals performed equally or somewhat better than cohorts that received vitamin E supplementation at a level 20 times the recommended intake. Therefore, it can be said that in addition to performing better than vitamin-E supplementation as a long term antioxidant diet, the prolonged practice of energy restriction, combined with specific carbohydrate limitation, may not affect the normal behavior of the adult rat. Albeit a possible analgesic effect could have played a role in the response of the vitamin-E supplemented group, we think this is an issue that should deserve further investigation.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian agencies CNPq and CAPES for the doctoral fellowships and to Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Jr., of the School of Nutrition, Federal University of Alagoas for his kind support with the statistical treatment of the data.

### REFERENCES

- Harrison DE, Archer JR. Genotype modulates the effects of caloric restriction on aging process in rodents. Effects of caloric restriction on aging phenomena. In: Ingram DK, Baker GT, Shock NW, eds. The potential for nutrition modulation of the aging processes, Trumbull: Food and Nutrition Press, 1991: pp. 137-155.
- Weindruch R. Caloric restriction and aging. *Sci Am* 1996; 274: p.32-38.
- Anson RM. Absolute versus Relative Caloric Intake. Clues to the Mechanism of Calorie/Aging-Rate Interactions. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 427-429.
- Ingram DK. Effects of dietary restriction on brain and behavioral function in aging rodents. In: Ingram DK, Baker GT, Shock NW, eds. The potential for nutrition modulation of the aging processes, Trumbull: Food and Nutrition Press, 1991: pp. 289-310.
- Socci DJ, Crandall BM, Arendash GW. Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. *Brain Res* 1995; 693: 88-94.
- Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, et al. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 93: 4765-4769.
- Wu A, Wan F, Sun X, et al. Effects of dietary restriction on growth, neurobehavior, and reproduction in developing Kunming mice. *Toxicol Sci* 2002; 70: 238-244.
- Wu A, Sun X, Liu Y. Effects of caloric restriction on cognition and behavior in developing mice. *Neurosci Lett* 2003; 339: 166-168.
- Maswood N, Young J, Tilmont E, et al. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *PNAS* 2004; 101: 18171-18176.
- De Oliveira LM. Malnutrition and environment: interaction effects upon animal behavior. *Revista Chilena de Nutrición* 1985; 13: 99-108.
- Almeida SS, Garcia RA, De Oliveira LM. Effects of early protein: malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 1993; 34: 749-752.
- Almeida SS, De Oliveira LM. Acquisition and extinction of jumping, two-way shuttle-box and bar press avoidance responses in malnourished rats: effects of shock intensity. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 2443-2452.
- Santucci LB, Daud MM, Almeida SS, et al. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 393-398.
- Singh U, Devaraj S. Vitamin E: Inflammation and atherosclerosis. *Vitamins and Hormones* 2007; 76: 519-549.
- Hathcock JN, Azzu A, Blumberg J, Bray T, et al. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:736-745.
- Kontush A, Schekatolina S. Vitamin E in neurodegenerative disorders. Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1031: 249-262.
- McDonald SR, Sohal RS, Forster MJ. Concurrent administration of coenzyme Q(10) and alpha-tocopherol improves learning in aged mice. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 729-736.
- Richwine AF, Godbout JP, Berg BM, et al. Improved psychomotor performance in aged mice fed diet high in antioxidants is associated with reduced ex vivo brain interleukin-6 production. *Brain Behav Immun* 2005; 19: 512-520.
- Oliveira SL, Diniz DB, Amaya-Farfan J. Carbohydrate energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. *Brit J Nutr (London)* 2003; 89: 89-96.

20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951.
21. Sharma A, Kumar A. Concurrent analysis of plasma retinol and  $\alpha$ -tocopherol by isocratic HPLC. *Indian J Exp Biol* 1990; 28: 780-782.
22. Fernandez MS, Gonzalez C, Patterson AM. Oil enriched diets and behavioral parameters in rats' recovery from early under-nutrition. *Physiol Behav* 1997; 62: 113-119.
23. Moreira GMS, De Araújo M, De Oliveira LM, et al. The behavior of protein-calorie-malnourished rats on the elevated plus-maze test: an ethopharmacological analysis. *Psychobiology* 1997; 25: 180-185.
24. Riul TR, Almeida PS, Carvalho AF, et al. Effects of different levels of protein and environmental stimulation on the behavior of young rats tested in the elevated plus-maze. *Nutr Neurosci* 1998; 1: 295-303.
25. Almeida SS, Araújo M, Moreira GMS, et al. Short-term social isolation does not reduce elevated plus-maze exploration in early protein malnourished rats. *Nutr Neurosci* 1998; 1: 103-110.
26. Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, et al. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res* 1989; 476: 10-15.
27. Hass BS, Lewis SM, Duffy PH, et al. Dietary restriction in humans: report on the little rock conference on the value, feasibility, and parameters of a proposed study, *Mech Ageing Dev* 1996; 91: 79-94.
28. Weed JL, Lane MA, Roth GS, et al. Activity measures in rhesus monkeys on long-term calorie restriction. *Physiol Behav* 1997; 62: 97-103.
29. Joseph JA, Shukitt-hale B, Denisov NA, et al. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci* 1998; 18: 8047-8055.
30. Shukitt-Hale B, Smith DE, Meydani M, et al. The effects of dietary antioxidants on psychomotor performance in aged mice. *Exp Gerontol* 1999; 34: 797-808.
31. Huston J, Burës J. Innate and motivated behavior. In: Burës J, Huston J, Buresöva O. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*, Netherlands: Elsevier, 1976: pp.49-59.
32. Sumien N, Heinrich KR, Sohal RS, et al. Short-term vitamin E intake fails to improve cognitive or psychomotor performance of aged mice. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1424-1433.
33. Kim HK, Kim JH, Gao X, et al. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* 2006; 53-62.
34. Rodgers RJ, Cole JC. Anxiety enhancement in the murine elevated plus-maze by immediate prior exposure to social stress. *Physiol Behav* 1993; 53: 383-388.
35. Almeida SS, Soares EG, Bichuette MZ, et al. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. *Physiol Behav* 1992; 51: 1195-1199.
36. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, et al. Differential effects of intermittent feeding and voluntary exercise on body weight and life span in adult rats. *J Gerontol* 1983; 38: 36-45.
37. Kryzhanovskii GN, Bakuleva LP, Luzina NL, et al. Role of the endogenous opioid system in the analgesic effect of  $\alpha$ -tocopherol in dysmenorrhea. *Bull Exp Biol Med* 1988; 105: 162-164.
38. Kryzhanovskii GN, Luzina NL, Yarygin KN.  $\alpha$ -tocopherol-induced activation of the endogenous opioid system. *Bull Exp Biol Med* 1989; 108: 1578-1579.

Recibido: 01-09-2008

Aceptado: 23-05-2009

## Adiponectina, insulina y glicemia, en individuos con sobrepeso u obesidad sometidos a un régimen de alimentación rico en carbohidratos complejos

*Dora Cristina González Rodríguez, Liseti Solano R., Julio César González Martínez*

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

**RESUMEN.** La adiponectina es una citoquina secretada por el tejido adiposo, que regula el metabolismo energético, estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante aumento de la sensibilidad a la insulina. Se evaluaron niveles séricos de adiponectina, insulina y glicemia, y su relación con pérdida de peso en 56 individuos con diagnóstico de sobrepeso y obesidad bajo un régimen de alimentación hipocalórico, basado en el consumo de carbohidratos complejos (cereal rico en fibra durante seis semanas). Se realizó antropometría y determinación de adiponectina e insulina (ELISA), glicemia (Colorimétrico-enzimático). Los datos se analizaron por pruebas no paramétricas para comparaciones de muestras independientes o relacionadas. Los participantes fueron (12 hombres, 44 mujeres, 20 a 55 años) 17 con diagnóstico de sobrepeso y 39 con obesidad. La adiponectina se encontró significativamente baja al inicio del programa en todos los participantes ( $4,47 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$ ), mayor en mujeres que en hombres ( $4,62 \pm 1,57$  vs  $3,93 \pm 1,86 \mu\text{g/mL}$ ). Para la glicemia e insulina sérica, los valores estuvieron dentro del rango normal ( $82,46 \pm 26,51$  mg/dL) y ( $14,12 \pm 10,151 \mu\text{U/mL}$ ) respectivamente sin diferencias significativas por sexo. Los participantes con sobrepeso tuvieron concentraciones significativamente mayores de adiponectina que los obesos desde el inicio hasta el final del programa. El régimen de alimentación promovió cambios en la concentración de adiponectina sérica durante el período de evaluación, notables a la segunda y sexta semana, encontrándose un incremento significativo en sus niveles séricos, y correlación negativa con el IMC y sexo a medida que perdían peso corporal.

**Palabras clave:** Adiponectina, obesidad, sobrepeso, dieta, fibra.

### INTRODUCCION

La obesidad ha sido catalogada como “la epidemia del siglo XXI”, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1995. El impacto de la obesidad es tan extremo y diverso que debería considerarse como uno de los mayores y más desatendidos problemas de salud pública de nuestros tiempos. Su prevalencia se ha incrementado rápidamente en las últimas décadas, inclusive en los países en desarrollo, lo que ha transformado a esta enfermedad en una condición de epidemia global.

**SUMMARY. Adiponectin, insulin and glucose concentrations in overweight and obese subjects after a complex carbohydrates (fiber) diet.** Adiponectin one of the cytokines secreted by the adipose tissue that regulates the energetic metabolism through glucose and insulin interactions., stimulates the oxidation of fatty acids, reduces the plasmatic triglycerides and improves glucose metabolism by increasing insulin sensibility. Serum concentrations of adiponectin, insulin and glucose were assessed in order to establish association to weight loss after a dietary regime based on consumption of complex carbohydrates (fiber) during six weeks. Overweight and obese subjects (n=56) were studied by anthropometry. Adiponectin and insulin were measured by ELISA and glucose by Colorimetry. Data was analyzed by non parametric tests to compare independent or related samples. 12 men and 44 women, aged 20 to 55 years, 17 overweight and 39 obese were assessed. Adiponectin concentration was significantly low at basal determination in all the subjects ( $4,47 \pm 1,64$ ); being higher in women ( $4,62 \pm 1,57$  vs  $3,93 \pm 1,86 \mu\text{U/mL}$  in men), while glucose and insulin values were at normal range ( $82,46 \pm 26,51$  mg/dL and  $14,12 \pm 10,15 \mu\text{U/mL}$ ) respectively with no significant differences for sex. Overweight subjects had significantly higher adiponectin concentrations than obese participants, at all measurements. Dietary regime promoted significant increase in adiponectin concentration at second and sixth week, with a negative correlation to body mass index and gender as they lost body weight.

**Key word:** Adiponectin, obesity, overweight, diet, fiber.

El mecanismo más constante por el que aparece el sobrepeso corporal y más tarde la obesidad, es el mantenimiento de un balance energético positivo de larga duración, es decir, el consumo de nutrientes y energía, durante mucho tiempo, es superior al gasto calórico. De esta manera, la energía en exceso se acumula, en forma de grasa, en los depósitos de tejido adiposo, que además de actuar como almacén, produce hormonas y numerosas proteínas que participan en la regulación del metabolismo entre las cuales se encuentra la adiponectina (Acrp30) (1)

La Acrp30 (Adipocyte Complement Related Protein), también conocida como AdipoQ, adiponectina ó apM1, es

una proteína expresada exclusivamente en adipocitos diferenciados. Esta hormona estimula el consumo de grasa a nivel del músculo esquelético, favoreciendo el uso de la glucosa como combustible metabólico.

Los niveles séricos de Acrp30 se correlacionan negativamente con el índice de masa corporal y con la cantidad de grasa visceral, estando su secreción modulada por la insulina, por lo que está regulada por factores nutricionales. Aunque el papel fisiológico de la adiponectina no está claro todavía, se le puede reconocer una intervención en la regulación del metabolismo energético. Debido a su capacidad de reducir la glucosa en sangre en los casos de resistencia a la insulina, la adiponectina posee el potencial de convertirse en una terapia contra la diabetes (2).

La adiponectina desempeña un papel destacado en la etiología de la resistencia a la insulina en condiciones como la diabetes tipo 2 y la obesidad. Existe evidencia de que la adiponectina reduce los niveles de glucosa, en pacientes obesos, en individuos que bajaron de peso rápidamente, así como en casos de intolerancia a la glucosa, dislipidemia, e hipertensión arterial (2).

Se conoce que una dieta rica en fibra protege contra la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, a través de la disminución de los niveles de insulina circulantes. Por eso, en países donde las enfermedades crónicas no transmisibles constituyen un problema de salud pública se está promoviendo el consumo de carbohidratos complejos siendo esto una meta para mejorar el estado nutricional, así como para el manejo de la diabetes mellitus, dislipidemias y la obesidad (3,4).

De estos hallazgos se evidencia la importancia de avanzar en el esclarecimiento de la fisiopatología, de los factores de riesgo y la prevención de la obesidad. Adicionalmente, por la carencia de información nacional, con respecto a este grave problema de salud pública, se propuso esta investigación la cual tiene como objetivo evaluar niveles de adiponectina, insulina y glicemia y su asociación en individuos con sobrepeso u obesidad sometidos a un régimen de alimentación rico en carbohidratos complejos que asistieron como voluntarios a participar en un programa de pérdida de peso, conducido en la Consulta de Obesidad, del Centro de Investigaciones en Nutrición "Dr. Eleazar Lara Pantín" de la Universidad de Carabobo (CEINUT) ubicado en Valencia, estado Carabobo (Venezuela),

## MATERIALES Y METODOS

Se realizó una investigación de tipo correlacional y explicativa, con un diseño experimental (5).

El universo estuvo constituido por aquellas personas que contestaron a un anuncio de prensa universitaria, en el cual se solicitaban voluntarios para participar en un programa de reducción de peso. La muestra se constituyó por un grupo de

56 individuos de vida libre, sin enfermedad aparente o referida por el participante, 12 hombres y 44 mujeres en edades comprendidas entre 20 y 55 años, quienes fueron seleccionados según su índice de masa corporal y por su aceptación voluntaria a participar en un programa especial de tratamiento de sobrepeso, consistente en sustitución de dos comidas por cereal, leche descremada y fruta durante dos semanas.

Los participantes cumplieron con un interrogatorio directo y llenado de encuesta para definir el cumplimiento de los siguientes criterios de inclusión: Ser consumidores frecuentes de cereal en el desayuno (al menos dos veces por semana), tener actividad física de ligera a moderada (máxima actividad realizada: caminatas de media hora o actividad equiparable, dos veces a la semana), no presentar patologías evidentes, no estar sometidos a regímenes dietéticos especiales o de pérdida de peso, no fumadores por lo menos los dos meses previos a su participación, no estar recibiendo o haber recibido medicamentos que influyeran sobre el apetito o el peso corporal, no haber tenido variaciones de peso mayores a tres kilos en los últimos tres meses, que realizaran al menos tres comidas diarias y que fueran tolerantes a la lactosa. Se excluyeron del estudio aquellas personas diabéticas o hipertensas, así como las que presentaron alguna reacción adversa durante el tratamiento, tales como urticaria, edema, diarrea crónica, alergia respiratoria o gastritis, quienes fueron atendidos inmediatamente, sugiriéndose medidas terapéuticas por los médicos del programa.

Los participantes fueron sometidos a un régimen hipocalórico basado en el consumo de un cereal rico en carbohidratos complejos, el cual se describe a continuación:

En las primeras dos semanas, el participante debía sustituir el desayuno y la cena o el desayuno y el almuerzo, según preferencia; por una comida constituida por 1 taza de cereal rico en fibra, ½ taza de leche descremada y una ración de fruta. Debía realizar dos meriendas con una ración de frutas, una a media mañana y otra a media tarde y la tercera comida debía ser con bajo contenido de grasa según la alimentación habitual del participante, acompañada de otra ración de fruta.

En las siguientes cuatro semanas; el participante continuó con la sustitución; pero sólo de una comida por cereal, al día y las meriendas y la disminución del consumo de grasas. Se dieron tanto las instrucciones dietarias para promover el consumo de alimentos ricos en carbohidratos complejos como educación nutricional.

Luego de su adscripción al programa, fueron citados en grupos pequeños para mayor facilidad de manejo individual a fin de realizar la evaluación antropométrica, dietaria y bioquímica, al inicio, a la segunda semana y a la sexta semana de régimen.

Para la evaluación antropométrica se obtuvo el peso, la talla, y se calculó el índice de masa corporal mediante la

fórmula: Índice de Masa Corporal= Peso (kg.)/Talla<sup>2</sup> (m). Se procedió a clasificarlos de acuerdo a su índice de masa corporal, según referencias de OMS(6): Índice de masa corporal mayor de 25 kg/m<sup>2</sup> hasta 29,9 kg/m<sup>2</sup>: Sobrepeso; mayor de 30 kg/m<sup>2</sup>, Obesidad.

La evaluación dietaria se realizó mediante recolección de tres registros de consumo de alimentos que llevó el participante (dos en días de trabajo y uno en fin de semana) y un recordatorio de 24 horas el día de la consulta, para validar la información. A fin de asegurar la calidad de la medición, así como su estandarización, todos los participantes recibieron un juego de medidas prácticas (tazas, cucharillas) y el correspondiente instructivo para que fuera llenado por el participante con tranquilidad, en su hogar.

La evaluación bioquímica se cumplió previo ayuno de 12 horas, mediante extracción de 5 mL de sangre, para la determinación de Adiponectina e insulina por Enzimo inmunoanálisis (ELISA, Biovendor Laboratory Medicine, INC y DRG Diagnostics respectivamente) y glicemia por método colorimétrico-enzimático (Glucosa-GOD-PAP LABKIT). Los valores de referencia utilizados para insulina y glucosa fueron, respectivamente 2–25 µU/mL y 55–110 mg/dL.

Para la adiponectina, se utilizaron valores de acuerdo a lo sugerido por el fabricante del kit, según índice de masa corporal (ELISA, Biovendor Laboratory Medicine, INC).

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 11,0, mediante un análisis exploratorio para evaluar la distribución de la muestra, (gráficos de normalidad y las pruebas de significación de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro y Wilk) (7). Como algunas variables no mostraron una distribución normal y no se normalizaron con transformación logarítmica, se utilizaron pruebas no paramétricas para los análisis de comparaciones de medias para dos o más variables de muestras independientes o relacionadas: Prueba de Mann-Whitney; prueba de Kruskal-Wallis H; prueba de Wilcoxon y test de Friedman. El nivel de significación con el que se trabajaron los datos fue de 0,05 con base en un intervalo de confianza del 95 por ciento (7).

## RESULTADOS

Se trata de un grupo de 56 personas diagnosticadas con sobrepeso u obesidad que recibieron un plan de tratamiento dietario basado en restricción de calorías y aumento de consumo de carbohidratos complejos (cereal rico en fibra). La muestra quedó conformada por 12 hombres y 44 mujeres en edades entre 20 y 55 años, en quienes la prevalencia de sobrepeso fue de 30,3% (n=17) y de obesidad, de 69,6% (n=39). El 82,35% de los individuos con sobrepeso eran del sexo femenino y el 17,6% eran del sexo masculino y de los individuos obesos el 76,9% eran de sexo femenino y el 23% del sexo masculino.

A las dos semanas de haber iniciado el régimen dietario, cinco personas (8,9%) cambiaron de sobrepeso a normalidad y algunos obesos perdieron peso suficiente para ser clasificados como sobrepeso, lo cual se observa en la disminución del número de obesos entre el inicio (69,6%) y el final (53,6 %) del período evaluado.

En la Tabla 1, se presentan los niveles séricos de las variables de laboratorio en el período de evaluación, para todos los 56 participantes estudiados, a fin de caracterizar los cambios obtenidos. Se destaca que en los promedios obtenidos en los valores de adiponectina hubo una variación notable, aunque no alcanzó significado estadístico; de 4,47 µg/mL al inicio aumentando sus valores sanguíneos hasta 13,48 µg/mL, a diferencia de los niveles de glicemia que disminuyeron sus valores al inicio de 82,56 mg/dL hasta 75,96 mg/dL a la sexta semana y de la insulina; que aumentó ligeramente al finalizar el período de evaluación.

TABLA 1  
Estadísticos descriptivos de las variables bioquímicas al inicio, segunda y sexta semana de evaluación (n: 56)

Variables bioquímicas	Promedio	D.E	Mínimo	Máximo
Al Inicio				
Adiponectina (µg/mL)	4,47	1,64	2,16	9,72
Glicemia (mg/dL)	82,46	26,51	58,00	208
Insulina (µU/mL)	14,12	10,15	1,5	60
A las dos semanas				
Adiponectina (µg/mL)	9,58	2,94	5,00	20
Glicemia (mg/dL)	77,11	18,29	56	180
Insulina (µU/mL)	11,70	9,43	1,5	62,2
A las seis semanas				
Adiponectina (µg/mL)	13,48	3,13	8,00	22,0
Glicemia (mg/dL)	75,96	18,50	60	168
Insulina (µU/mL)	14,20	10,81	2,6	58,1

Media ± DE (p significativa <0,05)

En la Tabla 2 se presentan los valores séricos de adiponectina de los participantes según el índice de masa corporal, encontrándose niveles significativamente mayores de adiponectina en aquellos que presentaron sobrepeso en comparación con los obesos, desde el inicio hasta el final del programa de alimentación. Aunque al inicio todos los participantes tuvieron valores disminuidos de adiponectina, a medida que perdían peso fue incrementándose las concentraciones, en mayor proporción para los sujetos con sobrepeso que en los obesos. No hubo relación estadísticamente significativa (p no significativo > 0,05).

Dado que no existen valores referenciales para poblaciones sobre adiponectina, y afines del análisis y de establecer los

puntos de corte para la población en estudio, se realizó una distribución percentilar de los niveles séricos de adiponectina según el fabricante. Por lo tanto sobre la base de hallazgos previos que señalan que la adiponectina se encuentra mas baja en las personas con obesidad (8,9) se presentan los valores de la Tabla 3, de prevalencia de las concentraciones obtenidas en el estudio según el fabricante (Biovendor Laboratory Medicine, INC) y la desviación percentilar de los individuos. Se puede observar que el 98,2% de los participantes presentaron niveles bajos de adiponectina para el inicio del programa dietético, mientras que para la segunda semana este porcentaje descendió a un 85 % alcanzando a la sexta semana, el 42,8%.

TABLA 2

Concentración de adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ ) según diagnóstico nutricional antropométrico durante el período de evaluación

IMC	Adiponectina		
	Al inicio ( $\bar{X} \pm \text{DE}$ )	A dos semanas ( $\bar{X} \pm \text{DE}$ )	A seis semanas ( $\bar{X} \pm \text{DE}$ )
Normal	—	9,4 $\pm$ 3,35	12,96 $\pm$ 2,51
Sobrepeso	4,70 $\pm$ 0,29	10,18 $\pm$ 0,49	13,700,54
Obeso	4,05 $\pm$ 0,28	8,49 $\pm$ 0,59	13,060,64
	Mann-Whitney p: 0,119	Kruskal-wallis p: 0,322	Kruskal-wallis p: 0,725

Prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes y Kruskal-wallis para tres muestras independientes: \* p significativa < 0,05. \*Los valores se presentan como rango promedio, ajustado a la prueba estadística utilizada.

TABLA 3

Concentración de adiponectina comparando valores referenciales del fabricante (vrf) y distribución percentilar obtenida (dpo) durante el período de evaluación

Concentración de adiponectina	Tiempos de evaluación					
	Inicio		A dos semanas		A seis semanas	
	VRF	DPO	VRF	DPO	VRF	DPO
Baja	98,2%	17,9%	85,75%	0%	42,9%	0%
Normal	1,8%	82,1%	14,35%	100%	57,1%	100%

En la Tabla 4 se presentan los estadísticos descriptivos de las variables de ingesta dietaria de macronutrientes en el período de evaluación para el grupo completo de sujetos. Durante el período de estudio, hubo disminución del consumo y adecuación de energía (calorías), carbohidratos y grasas. Se observa que el consumo y adecuación de proteínas no

experimentó cambios considerables, pero si existió un aumento notable en el consumo y adecuación de fibra. Se reporta una disminución significativa de los valores de ingesta dietética de macronutrientes al inicio, dos semanas y seis semanas para todas las variables, a excepción del consumo de fibra.

TABLA 4

Promedio de ingesta dietaria de macronutrientes durante el período de evaluación (n: 56)

Ingesta dietaria	Inicio (Media $\pm$ DE)	A dos semanas (Media $\pm$ DE)	A seis semanas (Media $\pm$ DE)
Consumo energía (Kcal/d)	1629 $\pm$ 758	1058 $\pm$ 277	1106 $\pm$ 305
Adecuación energía (%)	75 $\pm$ 33	51 $\pm$ 11	52 $\pm$ 14
Consumo proteínas (g/d)	60 $\pm$ 22	52 $\pm$ 12	57 $\pm$ 14
Adecuación proteínas (%)	90 $\pm$ 31	80 $\pm$ 19	88 $\pm$ 22
Consumo carbohidratos (g/d)	248 $\pm$ 144	160 $\pm$ 44	164 $\pm$ 49
Consumo fibra (g/d)	10 $\pm$ 9	14 $\pm$ 3	20 $\pm$ 14
Adecuación fibra (%)	23 $\pm$ 19	35 $\pm$ 7	29 $\pm$ 10
Consumo grasa (g/d)	51 $\pm$ 26	25 $\pm$ 10	28 $\pm$ 11

Dado que para la evaluación de la segunda y de la sexta semana algunos sujetos pasaron a tener peso normal se describe la información a pesar del pequeño número de participantes, en la Tabla 5. Para el consumo y adecuación de energía se encontró una disminución marcada entre el inicio y la sexta semana, tanto en los participantes con sobrepeso, como para los obesos. Para el consumo y adecuación de proteínas hubo una disminución moderada durante la evaluación. El consumo y adecuación de fibra aumentó en todas las categorías, tanto para los obesos, sobrepesos, como para los que alcanzaron un peso normal.

## DISCUSION

La adiponectina es una de las citoquinas secretada por el tejido adiposo, cuyos efectos fisiológicos están aún por esclarecer. Sin embargo se ha demostrado que regula el metabolismo energético del organismo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina. y aunque su síntesis es específica del adipocito, se observa una correlación negativa entre sus niveles y el índice de masa corporal. Esto contrasta con la mayoría de las adipocitocinas cuyos niveles están aumentados en la obesidad en proporción directa con el aumento de la masa corporal.

TABLA 5  
Estadísticos descriptivos de las variables dietarias, según índice de masa corporal de los participantes al inicio, segunda y sexta semana de evaluación (n: 56)

Categorías	Normal Media ± DS	Sobrepeso Media ± DS	Obeso Media ± DS
Consumo energía (Kcal/d)			
Al inicio		1674,25±986,66	1610,79±656,22
A las dos semanas	864,05 ± 91,03	1231,57±394,30	1129,23±296,02
A las seis semanas	1099,62±154,19	1127,57±332,62	1094,34±294,86
Adecuación energía (%)			
Al inicio		77,87±43,70	73,87±28,26
A las dos semanas	49,75±5,84	60,83±15,96	51,60±14,61
A las seis semanas	57,00±11,72	57,22±11,12	50,11±14,16
Consumo proteínas (g/d)			
Al inicio		13,80±4,58	59,45±22,31
A las dos semanas	49,55±13,29	58,89±16,29	57,33±15,31
A las seis semanas	56,94±11,79	56,34±13,58	56,89±13,76
Adecuación proteínas (%)			
Al inicio		107,68±27,86	82,12±29,91
A las dos semanas	95,45±19,58	108,62±25,22	82,85±21,59
A las seis semanas	118,56±20,07	103,93±19,97	82,18±19,29
Consumo carbohidratos (g/d)			
Al inicio		270,79±209,01	238,00±108,70
A las dos semanas	132,64±21,13	191,12±74,16	165,33±45,87
A las seis semanas	158,68±35,60	171,45±54,86	161,30±46,63
Consumo fibra (g/d)			
Al inicio		12,04±15,11	9,33±5,32
A las dos semanas	13,02±1,89	13,80±4,58	12,23±4,73
A las seis semanas	15,24±2,61	14,59±4,67	21,06±15,53
adecuación fibra (%)			
Al inicio		29,37±30,54	20,74±11,14
A las dos semanas	37,40±5,01	34,80±9,55	27,99±10,87
A las seis semanas	41,50±4,15	33,15±11,99	27,37±10,01
Consumo grasa (g/d)			
Al inicio		51,90±24,50	50,60±26,79
A las dos semanas	18,79±2,15	29,66±13,02	29,50±11,80
A las seis semanas	29,51±5,07	28,09±10,80	27,51±10,71

Media ± DE (p significativa <0,05)

En la presente investigación se encontraron valores bajos de adiponectina en la medición basal, es decir, antes del inicio del régimen de alimentación de restricción calórica, para todos los participantes. Este hallazgo coincide con los descritos por Scherer (10), Hu (11), Hotta (12) y Yang(13), quienes han reportado niveles de adiponectina inversamente correlacionados con el tejido adiposo.

Se ha evidenciado que la pérdida de peso cuando el obeso es tratado con cirugía bariática, se acompaña de un incremento significativo de la adiponectina circulante (13-15). De la misma manera, en mujeres con obesidad mórbida sometidas a cirugía gástrica estudiadas por Kopp (16), se reportó que el incremento

pronunciado de las concentraciones de adiponectina fue inducido por la pérdida de peso postoperatorio de bypass gástrico. También estos cambios son observados en pacientes con sobrepeso y obesidad sometidos a dermolipectomía, según Rizzo (17), quienes refirieron cambios en los marcadores inflamatorios asociados a obesidad (interleucinas 6, 10, factor de necrosis tumoral), resistencia a la insulina y enfermedad coronaria, así como en la leptina, resistina, insulina, ácidos grasos libres, triglicéridos y aumento de adiponectina plasmática en un grupo de veinte mujeres obesas luego de diez días de haber sido sometidas a cirugía. Sugieren que la corrección del exceso de peso corporal, es un método que

previene los daños metabólicos asociados a obesidad.

Los hallazgos del presente estudio contribuyen a la hipótesis de que al disminuir la cantidad del tejido adiposo, aumentan los niveles de adiponectina, lo cual pudiera ser una explicación indirecta de por qué la obesidad incrementa el riesgo de diabetes y la enfermedad cardiovascular, que es una de las complicaciones tardías de esta enfermedad.

Esta evaluación demostró que aun cuando todos los participantes presentaron bajas concentraciones de adiponectina al inicio, aquellos con sobrepeso tuvieron niveles significativamente mayores de adiponectina que los que presentaron obesidad desde el inicio hasta el final del programa de alimentación. Este hallazgo concuerda con la correlación negativa encontrada por otros investigadores entre los niveles circulantes de adiponectina, IMC y porcentaje de grasa corporal (8,9) considerando la mayor cantidad de grasa en la obesidad que en el sobrepeso. Esta correlación inversa es todavía más concluyente, cuando se compara la cantidad de adiponectina con la cantidad de grasa corporal determinada mediante impedancia bioeléctrica o tomografía computarizada (18).

En un estudio realizado por Tungtrongchitr (19) en 48 hombres y 166 mujeres con sobrepeso y obesidad; con edades entre 18 y 55 años de edad, se demostraron niveles séricos de adiponectina superiores a los reportados, así como variaciones según el género.

Aunque los mecanismos fisiológicos por medio de los cuales actúa la adiponectina no están claros, se ha descrito que la adiponectina incrementa la captación de glucosa y la sensibilidad a insulina mediante interacción con la vía de señalización de la insulina, regulando el estado de fosforilación del receptor de la insulina (20) o la propia actividad de la tirosinaquinasa propia de este receptor (2). Por lo tanto se deduce que la actividad biológica de la adiponectina es ejercida particularmente sobre el hígado, bloqueando el ingreso de ácidos grasos no esterificados, estimula su oxidación y reduce la salida de glucosa a la circulación sanguínea, y en el músculo esquelético incrementa la captación de glucosa y promueve la oxidación de los ácidos grasos, de esta manera la adiponectina regula el equilibrio metabólico y la reserva energética corporal.

Otro trabajo de Stefan (21), demostró una correlación negativa entre la concentración de adiponectina en ayunas con la producción endógena de glucosa tanto en condiciones basales como después de un estímulo de insulina. Los resultados del presente trabajo concuerdan con estos reportes de otros autores, ya que se encontró una disminución de los niveles séricos de glucosa a medida que avanzaba el régimen dietario, lo que demuestra que el aumento de adiponectina puede ser uno de los factores que contribuye a la mejoría de la glicemia en los pacientes estudiados.

Así mismo los niveles séricos de insulina disminuyeron a la segunda semana del plan dietario, aumentando ligeramente

al finalizar el período de evaluación, lo que se explica por el cambio en la cantidad de energía consumida en la dieta a la sexta semana de evaluación; cuando los sujetos pasaron a un régimen de mayor libertad en su ingesta. Este hallazgo concuerda con estudios (9,18), que han demostrado que existe una relación directa entre los niveles circulantes de adiponectina y la sensibilidad a la insulina, debido a que una de las acciones favorables y esenciales de la adiponectina es la sensibilización al efecto de la insulina. Una investigación realizada por Hotta (12), reportó que en monos rhesus genéticamente predispuestos a desarrollar resistencia insulínica, los niveles circulantes de adiponectina disminuyeron en forma directamente proporcional a la progresión de la resistencia insulínica durante el desarrollo de la diabetes tipo 2. Estos autores, demostraron una correlación negativa entre la concentración de adiponectina y el peso corporal y una correlación positiva con la captación de glucosa estimulada por la insulina. En estos monos, el descenso de los niveles de adiponectina precede a una hiperglicemia.

Un aspecto a considerar es que la obesidad se produce por un desequilibrio prolongado entre la ingesta calórica y el gasto energético. El exceso de ingesta conduce a un aumento progresivo de la grasa corporal y a la obesidad, incrementando así el tejido adiposo; siendo su principal almacenar el exceso de energía metabólica que se acumula en forma de lípidos, para que pueda ser utilizada durante períodos de privación calórica, por lo que el esfuerzo por reducir grasa corporal se centra en la reducción de la ingesta. El presente trabajo se fundamentó en un régimen de alimentación de restricción calórica, basado en el consumo de cereal rico en carbohidratos complejos, permitiendo la disminución de peso por parte de los participantes. Durante el período de adhesión a este régimen de alimentación se observó un aumento de niveles de adiponectina al transcurrir las semanas evaluadas, acompañado de disminución de los niveles de glucosa, lo que coincide con reportes de aumento de adiponectina sérica cuando hay restricción energética, es decir, cuando la ingesta de energía es menor a la que necesita el organismo para cumplir sus funciones metabólicas, (22,23).

Otra investigación realizada por Lazzer (24), en la cual se evaluaron los cambios hormonales del adipocito asociados a pérdida de peso en 26 adolescentes con obesidad mórbida durante un período de trece meses, presentó evidencias de la inducción de un incremento significativo de concentraciones plasmáticas de adiponectina asociadas a una disminución de la glicemia, la insulina, el colesterol y de las concentraciones de leptina plasmática. Estos resultados demuestran la importancia de mantener un régimen alimentario y actividad física moderada para preservar los efectos beneficiosos de un programa de adelgazamiento.

En otro trabajo, realizado por Liu (25), se demostró que la expresión génica de adiponectina ARNm en el tejido adiposo subcutáneo puede responder a cambios de energía a corto plazo. Este hallazgo se observó en algunas mujeres obesas en respuesta a una dieta de muy bajas calorías demostrando que tanto los niveles de adiposidad como insulina pueden contribuir a la variación en el gen de adiponectina en respuesta a cambios de energía.

El presente reporte indica que los cambios drásticos en la ingesta de energía a corto plazo inducidos por el régimen de consumo de carbohidratos complejos produjeron modificaciones en los niveles séricos de adiponectina, de glucosa y de insulina y variaciones de peso. Es decir que el programa alimentario fue eficiente en la generación de pérdida de peso, lo que indujo modificaciones significativas en las concentraciones de adiponectina circulante, en la glicemia y en la insulina sérica, tanto en mujeres como en hombres obesos y con sobrepeso.

#### REFERENCIAS

1. Castañeda O. Adipocitoquinas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2002; 10(3): 147-150.
2. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. 2001; 7: 941-946.
3. Hill J. Los Carbohidratos en el control de peso. 2000; 1- 8. *Boletín Dieta y Salud, Órgano Informativo de Alimentos Kellogg's sobre la Relación entre la Nutrición y la Salud*. 7
4. Bowman J. Comparison Of Low-Carbohydrate Vs .High-Carbohydrate Diets: Energy Restriction, Nutrient Quality And Correlation To Body Mass Index *Am College Nutr*; 2002;21(3): 268-274.
5. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. McGraw-Hill Interamericana de México, S.A. de C.V. p. 107-185. 2003
6. Organización Mundial de la Salud, (OMS) Obesidad y Sobrepeso 2006. Nota descriptiva N° 311. [Citado 2007: Febrero 07]; Disponible URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.
7. Pardo A, Ruiz M. SPSS 11 Guía para el análisis de datos. McGraw Hill. Interamericana de España, S.A.U. Edición II. 2002.
8. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al.. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 2;257(1):79-83.
9. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley R, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1930-5.
10. Scherer P, Williams S, Fogliano M, Baldini G, and Lodish H. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270:26746-26749.
11. Hu E, Liang P, Spiegelman B. AdipoQ is a novel adipocyte-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996; 271:10697-10703
12. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et AL. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* .2000;20: 1595-1599.
13. Yang W, Lee W, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Ling C, et al Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3815–3819.
14. Faraj M, Havel P, Phelis S, Blank D, Sniderman A, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Apr ;88(4):1594-602
15. Pender C, Goldfine I, Tanner C, Pories J, MacDonald K, Havel P, et al.. Muscle insulin receptor concentrations in obese patients post bariatric surgery: relationship to hyperinsulinemia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 363– 9.
16. Kopp H, Krzyzanowska K, Mohlig M, Spranger J, Pfeiffer A, Scherthner G. Effects of marked weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation and insulin resistance in morbidly obese women. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(7):766-71.
17. Rizzo M, Paolisso G, Grella R, Barbieri M, Grella E, Ragno E, et al. . Is dermolipectomy effective in improving insulin action and lowering inflammatory markers in obese women?. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63(3):253-8.
18. Kern P, Di Gregorio G, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 2003;52:1779-1785
19. Tungtrongchitr R, Srichaoren P, Pongpaew P, Phonrat B, Arthan D, Vudhivai N, et al. Adiponectin/ACP30, a collagen-like plasma protein in relation to anthropometric measurement in Thai overweight and obese subjects. *Int J Food Sci Nutr*. 2005;56(3):193-201.
20. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay R, et al. Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 2002; 51: 1884-1888.
21. Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, Weyer C, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care*. 2003;26 (12):3315-9.
22. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin Receptors. *Endocr. Rev*. 2005; 26(3): 439-451.
23. Reinehr T, Roth C, Alexy U, Kersting M, Kiess W, Andler W. Ghrelin levels before and after reduction of overweight due to a low-fat high-carbohydrate diet in obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2005; 29(4):362-8.
24. Lazer S, Vermorel M, Montaurier C, Meyer M, Boirie Y. Changes in adipocyte hormones and lipid oxidation associated with weight loss and regain in severely obese adolescents. *Int J Obes (Lond)*.2005; 29(10):1184-91.

25. Liu Y, Lacorte J, Viguerie N, Poitou C, Pelloux V, Guy-Grand B. et al. Adiponectin gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese women in response to short-term very low calorie diet and refeeding. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 5881–5886.
26. Organización Mundial de la Salud (OMS) Global prevalence of underweight and obesity in adults, by level of development. 2000.) [Citado: 2007, Febrero 22]; Disponible URL: [http://www.who.int/nut/db\\_bmi.htm](http://www.who.int/nut/db_bmi.htm).

Recibido: 25-02-2009

Aceptado: 15-06-2009

## Etapas del cambio relacionadas con el consumo de frutas y verduras, actividad física y control del peso en estudiantes universitarios chilenos

María Angélica Mardones H., Sonia Olivares C., Jacqueline Araneda F., Nelly Gómez F.

Universidad del Bio Bio, Chillán, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Universidad de Chile, Santiago de Chile

**RESUMEN.** Como línea base para diseñar intervenciones efectivas en promoción de salud, se determinó el estado nutricional y las etapas del cambio respecto al consumo de frutas y verduras, la actividad física y el control del peso en 955 estudiantes de ambos sexos en la Universidad del Bio-Bio, Chile. La muestra fue seleccionada aleatoriamente por sede, facultad y carrera, con un nivel de confianza del 95% y un error máximo del 3%. Se realizó un análisis descriptivo y se evaluó la asociación entre el estado nutricional y las variables estudiadas aplicando la prueba de Chi<sup>2</sup>. Para determinar el estado nutricional se usó el índice de masa corporal y los criterios de la OMS para adultos. Para evaluar las etapas del cambio se aplicó un instrumento previamente validado por el INTA. La prevalencia de sobrepeso y obesidad alcanzó al 48,2% en los hombres y al 25,5% en las mujeres, ( $p < 0,0001$ ). Sólo 3,1% de los hombres y 7,3% de las mujeres consumían las 5 porciones diarias recomendadas de frutas y verduras. La mayoría consumía 1 a 2 porciones (69,5% hombres y 54,3% mujeres), y el resto 3 a 4 porciones (18,2% y 34,7%, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ). El 58% de los hombres y el 43% de las mujeres realizaban actividad física regularmente ( $p < 0,0001$ ). El 73,6% de los hombres y 79,3% de las mujeres estaban tratando de reducir o mantener su peso ( $p < 0,0002$ ). Se concluye que los estudiantes requieren intervenciones específicas y condiciones apropiadas para aumentar el consumo de frutas y verduras y la actividad física.

**Palabras clave:** Estudiantes universitarios, etapas del cambio, consumo de frutas y verduras, actividad física, control del peso, estado nutricional.

### INTRODUCCION

Desde mediados de los ochenta, en la población chilena se empezó a producir una rápida transición epidemiológica, llevándola desde una elevada prevalencia de desnutrición infantil a comienzos de los setenta, a un continuo aumento de la obesidad y los factores de riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación y la falta de actividad física (1). En efecto, la Encuesta Nacional de Salud (ENS) realizada en el año 2003, encontró una prevalencia de sobrepeso y obesidad de 61% en la población de 17 a 65 años, un 55% de la cual tenía un riesgo cardiovascular alto o muy alto. En los

**SUMMARY. Stages of change related to fruit and vegetables consumption, physical activity, and weight control in Chilean university students.** In order to design effective health promotion interventions, nutritional status and the stages of change related to the consumption of fruit and vegetables, physical activity, and weight control were determined in 955 students of both genders at the University of Bio-Bio, Chile. The sample was randomly selected by campus, faculty, and career, with a level of confidence of 95% and a maximum error of 3%. Beside the descriptive analysis, to evaluate the association among nutritional status, fruit and vegetables consumption, physical activity and weight control, Chi<sup>2</sup> test was applied. Nutritional status was determined by Body Mass Index and WHO reference standards for adults. A questionnaire previously validated by INTA was applied to evaluate the stages of change. The prevalence of overweight and obesity reached 48.2% in men and 25.5% in women ( $p < 0.0001$ ). Only 3.1% of men and 7.3% of women consumed the 5 recommended daily servings of fruit and vegetables. The majority consumed 1 or 2 daily servings (69.5% men and 54.3% women), and the rest 3 to 4 servings (18.2% and 34.7%, respectively) ( $p < 0.0001$ ). 58% of men and 43% of women carried out physical activity regularly ( $p < 0.0001$ ). 73.1% of men and 79.3% of women were trying to reduce or not to increase their weight ( $p < 0.0002$ ). It is concluded that students require specific interventions and appropriate conditions to increase their fruit and vegetables consumption, and physical activity.

**Key words:** University students, stages of change, fruit and vegetables consumption, physical activity, weight control, nutritional status.

jóvenes de 17 a 24 años, esta prevalencia alcanzaba al 25,4%. El sedentarismo afectaba al 90% de la población general y al 82% de los jóvenes y (2).

Debido a que el aumento de la obesidad y sus factores de riesgo constituyen un problema mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3-5), el Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer (WFCR) y el Instituto Americano de Investigación del Cáncer (AICR) (6), entre otros, han señalado que existe evidencia convincente sobre la contribución del peso saludable, la actividad física regular y el consumo de al menos 5 porciones de frutas y verduras todos los días, en la disminución del riesgo de diversas

enfermedades no transmisibles, como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer.

En los estudios que han incluido encuestas sobre el consumo de frutas y verduras en distintos grupos de la población chilena, se ha encontrado que éste es muy inferior al recomendado por la OMS, tanto en niños como en adultos, sin diferencias según nivel socioeconómico (NSE) (7-10).

Con el fin de enfrentar los desafíos de este perfil epidemiológico, el Ministerio de Salud creó el Consejo Nacional de Promoción de Salud en el año 1998 (11); publicó las primeras Guías Alimentarias para la población chilena en el año 1997 (12) y una segunda versión en el año 2005 (13); estableció el Etiquetado Nutricional obligatorio para los alimentos que se venden envasados a partir del año 2006 (14) y creó la Estrategia Global contra la Obesidad (EGO-Chile), también en el año 2006 (15). Estas estrategias, orientadas a la prevención y control de la obesidad, promueven el aumento de la actividad física y el consumo de una alimentación saludable.

El INTA de la Universidad de Chile, junto a otras universidades y empresas productoras y exportadoras de frutas y verduras, crearon la Corporación 5 al Día Chile, la que con el apoyo de los Ministerios de Agricultura, Salud, la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) está promoviendo el consumo de 5 porciones de frutas y verduras en los distintos segmentos de la población y la incorporación del tema en las intervenciones educativas que se realizan en escuelas, universidades y lugares de trabajo (16).

Considerando el importante papel que cumplen las universidades en el país, cuyo número de estudiantes aumentó de 100.000 en la década del ochenta a más de 700.000 a mediados del 2000, el Consejo Nacional de Promoción de la Salud decidió estimular la implementación de “universidades saludables”, con el fin de influir positivamente sobre la salud y bienestar de los estudiantes y contribuir al desarrollo de iniciativas semejantes, en los distintos campos laborales en los que trabajarán los futuros profesionales (17). El objetivo de este estudio fue contribuir a optimizar el Programa Universidad Saludable de la Universidad del Bio-Bio, para lo cual se determinaron las etapas del cambio respecto al consumo de frutas y verduras, la actividad física y el control del peso en estudiantes de la Universidad, como línea base para el diseño e implementación de intervenciones más efectivas de promoción y educación.

## MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio descriptivo de corte transversal en el que se determinó el estado nutricional y se aplicó una

encuesta sobre las etapas del cambio en actividad física, consumo de frutas y verduras y control del peso a estudiantes de la Universidad del Bio-Bio. El universo estuvo constituido por 9.093 estudiantes regulares de pregrado en sus sedes ubicadas en las ciudades de Concepción y Chillán, Región del Bio-Bio, en el sur de Chile. A partir de la información entregada por la Dirección de Registro Académico de la Universidad, se estratificó la población de estudiantes según Sede, Facultad en cada Sede y Carrera en cada Facultad. El tamaño de la muestra (955 estudiantes) se determinó para un nivel de confianza del 95% y un error máximo del 3%. Se excluyó a las estudiantes que se encontraban en etapa de gestación por tener indicaciones especiales en los tres ítems estudiados.

Para la evaluación del estado nutricional, se utilizó una balanza electrónica, marca SECA, modelo 841, con graduación de 100 gramos y un tallímetro marca SECA modelo 225 con precisión de 1 mm. La medición antropométrica de peso y talla fue aplicada según protocolo de Lohman T y cols (18).

La clasificación del estado nutricional se realizó calculando el IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), de acuerdo a los criterios recomendados por la OMS para el adulto: Bajo peso IMC percentil  $< 18,5$ ; peso normal IMC percentil  $= 18,5 - < 85$ ; sobrepeso IMC percentil  $= 85 - < 95$  y obesidad IMC percentil  $= 95$  (3).

Para la determinación de las etapas del cambio se utilizó un cuestionario previamente validado por el INTA (10, 19). Éste incluyó preguntas sobre el consumo de 5 porciones de frutas y verduras al día y etapas del cambio en este tema, adaptadas de las elaboradas por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (20), actualmente utilizadas en los Programas 5 al Día a nivel mundial. Para determinar las etapas del cambio sobre actividad física y control del peso, se aplicaron las preguntas validadas y aplicadas por el Programa de Salud Cardiovascular del Ministerio de Salud de Chile (21), a su vez adaptadas de las propuestas por Rossi y cols (22).

La encuesta fue aplicada por estudiantes de 5° año de la carrera de Nutrición y Dietética de la Universidad, previamente capacitados y estandarizados, a cada alumno de la muestra.

### Análisis estadístico

Se determinaron las estadísticas descriptivas de las variables analizadas mediante promedios  $\pm$  desviación estándar (DE) en el caso de las variables continuas y se construyeron tablas de contingencia para las variables categóricas. Para evaluar la asociación entre el estado nutricional y las variables consumo de frutas y verduras, actividad física y control del peso, se utilizó la prueba de Chi<sup>2</sup>. La comparación de la distribución de los hombres y mujeres según las etapas del cambio respecto al consumo de frutas y verduras fue realizada aplicando la prueba z para diferencias de proporciones. Las etapas del cambio relacionadas con el consumo de frutas y

verduras fueron determinadas en el grupo mayoritario (que consumía 1-2 porciones diarias).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software SPSS, versión 15.

## RESULTADOS

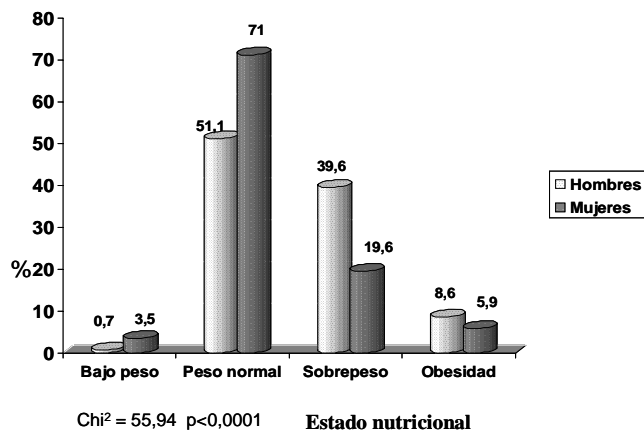
Las características de la muestra (n=955) se presentan en la tabla 1. Se estudió a 583 hombres (61,1%) y 372 mujeres (38,9%). El promedio de edad de los hombres fue de 22 años y el de las mujeres de 21 años, con un rango entre 17 a 34 años. La estatura promedio fue de 1,72 y 1,59 m en hombres y mujeres, respectivamente. El peso promedio en los hombres fue de 76,9 kg y en las mujeres de 59,4 kg.

### Estado nutricional

La Figura 1 muestra el estado nutricional de los 955 estudiantes encuestados, separados por género. Se encontró una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad, la que fue significativamente superior en los hombres (48,2% versus 25,5%, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ).

FIGURA 1

Estado nutricional de estudiantes universitarios chilenos, según género N = 955



### Consumo de frutas y verduras

La Figura 2 muestra que el consumo de frutas y verduras de los estudiantes de ambos géneros se encontraba bajo lo recomendado, observándose una asociación entre el número de porciones consumidas y el género del estudiante ( $p < 0,0001$ ). Por otra parte, en el grupo del 5,13% que ya había alcanzado la conducta esperada, el porcentaje de mujeres fue significativamente superior al de los hombres ( $p < 0,01$ ).

Al analizar las etapas del cambio respecto al consumo de frutas y verduras en el grupo mayoritario (que consumía 1 a 2 porciones diarias), se observó que el 59,1% de los hombres y el 73,5% de las mujeres se encontraba en la etapa de

preparación para la acción, es decir, tenían la intención de aumentar su consumo dentro de un mes. Un porcentaje importante, mayoritario en los hombres (40,9% versus 26,5% en las mujeres) se encontraban en las etapas de pre-contemplación o contemplación, respectivamente, es decir, no tenían la intención de aumentar su consumo o manifestaron que podrían tratar de empezar a aumentarlo, pero en unos seis meses después ( $p < 0,000$ ) (datos no mostrados).

El consumo de frutas y verduras y las etapas del cambio no presentaron diferencias según estado nutricional.

FIGURA 2

Porciones diarias de frutas y verduras que comen diariamente estudiantes universitarios chilenos, según género N = 955

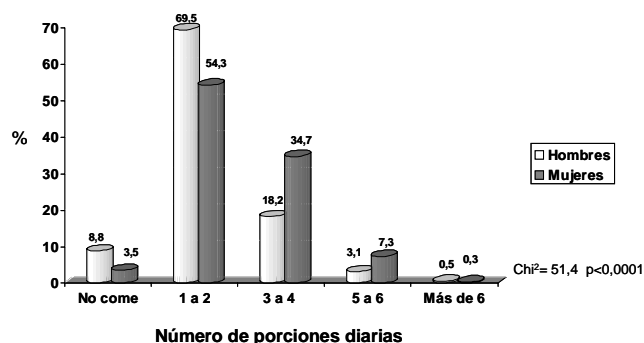


TABLA 1

Características de los estudiantes universitarios encuestados según género. Universidad del Bio Bio, Chile. (N=955)

Variables	Hombres (n = 583) $\bar{X} \pm 1DE$	Mujeres (n = 372) $\bar{X} \pm 1DE$
Edad (años)	22,1±2,9	21,3±2,8
Peso (kilos)	76,9±39,9	59,4±10,1
Talla (metros)	172,2±9,0	159,1±9,0
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,2±3,5	23,3±3,4

### Actividad Física

En la Tabla 2 se observa que el 58% de los hombres y el 43% de las mujeres manifestó estar realizando actividad física de acuerdo a lo recomendado desde hacía más de seis meses (etapa de mantenimiento) o menos de seis meses (etapa de acción). En la etapa de pre-contemplación (no tenían intención de aumentar su actividad física), se encontró a un 5% de los hombres y un 10% de las mujeres. En la etapa de contemplación (intención de empezar a realizar actividad física en los próximos seis meses), se encontró a un 16% de los

hombres y un 20% de las mujeres; y en la etapa de preparación para la acción (intención de comenzar a realizar actividad física dentro de un mes), se encontró al 21 % de los hombres y al 27% de las mujeres. La asociación entre las etapas del cambio de conducta frente a la actividad física y el género del estudiante fue significativa ( $p < 0,0001$ ). No se encontró relación entre las etapas del cambio en actividad física y el estado nutricional de los estudiantes.

TABLA 2

Etapas del cambio conductual en relación a la actividad física de estudiantes universitarios chilenos, según género (N= 955)

Etapas de cambio de conducta	Masculino		Femenino		Total	
	n	%	n	%	n	%
Precontemplación	29	5,0	37	10,0	66	7,0
Contemplación	94	16,0	74	20,0	168	17,6
Preparación para la acción	122	21,0	101	27,0	223	23,3
Acción	134	23,0	89	24,0	223	23,3
Mantención	204	35,0	71	19,0	275	28,8

Chi<sup>2</sup>= 33,9 p < 0,0001

### Control del peso

En la Tabla 3 se observa que al comparar las etapas del cambio respecto al control del peso según género (se recuerda que el 39,6% de los hombres tenía sobrepeso y el 8,9% obesidad, cifras que disminuían a 19,6 y 5,9% en las mujeres, respectivamente) el 73,6% de los hombres y el 79,3% de las mujeres manifestó encontrarse en la etapa de mantenimiento o acción, es decir manteniendo su peso o intentando no subirlo desde al menos seis meses. La asociación entre las etapas de cambio frente al control del peso y el género del estudiante resultó significativa ( $p < 0,0002$ ).

TABLA 3

Etapas del cambio conductual frente al control del peso de estudiantes universitarios chilenos, según género (N = 955)

Etapas de cambio de conducta	Masculino		Femenino		Total	
	n	%	n	%	n	%
Precontemplación	108	18,5	39	10,5	147	15,4
Contemplación	46	7,9	36	9,7	82	8,6
Preparación para la acción	0	0	2	0,5	2	0,2
Acción	112	19,2	105	28,2	217	22,7
Mantención	317	54,4	190	51,1	507	53,1

Chi<sup>2</sup> = 22,11 p < 0,0002

Al comparar las etapas del cambio según estado nutricional, en la Tabla 4 se observa que el 9,4% de los estudiantes con sobrepeso u obesidad se encontraba en la etapa de pre-contemplación (no tenían la intención de realizar alguna acción tendiente a controlar su peso) y el 15,5% se encontraba en la etapa de contemplación (intención de realizar alguna acción tendiente a controlar su peso en los próximos seis meses). En el mismo grupo, con sobrepeso u obesidad, el 36,9% se encontraba en la etapa de acción, es decir intentando controlar su peso desde hacía menos de seis meses y el 38,2% en la etapa de mantenimiento, es decir controlando su peso desde hacía más de seis meses. La tabla 4 muestra también que un 76,4% de los estudiantes de peso normal se encontraban en las etapas de acción y mantenimiento, es decir, preocupados de bajar o mantener su peso actual. La asociación entre las etapas del cambio y el estado nutricional del estudiante fue significativa ( $p < 0,0001$ ).

TABLA 4

Etapas del cambio conductual frente al control de peso de estudiantes universitarios chilenos, según género (N = 938)

Etapas de cambio de conducta	Masculino		Femenino		Total	
	n	%	n	%	n	%
Precontemplación	108	18,5	39	10,5	147	15,4
Contemplación	46	7,9	36	9,7	82	8,6
Preparación para la acción	0	0	2	0,5	2	0,2
Acción	112	19,2	105	28,2	217	22,7
Mantención	317	54,4	190	51,1	507	53,1

Chi<sup>2</sup> = 22,11 p < 0,0002

\* los 17 estudiantes de bajo peso no fueron incluidos en la tabla.

## DISCUSION

Los resultados de este estudio muestran que la mayoría de los estudiantes consumen 1 a 2 porciones de frutas y verduras al día (62%), semejantes a los obtenidos por Olivares y cols. (10) en estudiantes de la Universidad de Chile en el año 2008. En ambos estudios, sólo el 5% de los universitarios había alcanzado la meta esperada por la OMS, de consumir al menos 5 porciones al día (4). Este resultado es muy inferior al 40% de la población de los Estados Unidos que ya cumple dicha meta (23).

La II Encuesta Nacional de Calidad de Vida (7) encontró que sólo el 53% de los adultos comía frutas y el 47% comía verduras diariamente. Un porcentaje importante comía estos alimentos 2 a 3 veces por semana (20%) y un 5 y 12% rara vez comían frutas y verduras, respectivamente.

Cabe señalar que el bajo consumo se observa desde edades tempranas, como lo demuestran diversas investigaciones

realizadas en nuestro país. Olivares y cols. (24) en un estudio en 1.701 escolares de 7 a 13 años de edad, encontraron consumos de frutas y verduras equivalentes al 50 y 67% de lo recomendado por la OMS, respectivamente. Cuando se comparó el consumo de estos alimentos en escolares mujeres de NSE medio alto y medio bajo, se encontró un consumo cercano al 50% de lo recomendado, sin diferencias según NSE (9).

El bajo consumo de frutas y verduras encontrado en éste y otros estudios, ha sido asociado al aumento en el consumo de alimentos de alta densidad energética en todos los grupos de la población chilena (1,7, 9). No obstante, el que el 73,5% de las alumnas y el 59,1% de los alumnos de la Universidad del Bio-Bio que actualmente consumen 1 a 2 porciones al día, manifestaran la intención de aumentar este consumo en el próximo mes (etapa de preparación para la acción), abre nuevas oportunidades para el desarrollo de intervenciones orientadas a disminuir las barreras que los universitarios han señalado tener para comer las porciones recomendadas. Las principales barreras encontradas para comer las cantidades recomendadas de frutas y verduras en estudiantes universitarios han sido: “vivo solo/a y me da flojera prepararlas”, “no tengo tiempo” y “se me olvida comerlas” (10).

En lo que respecta a la actividad física, se tomó en consideración la recomendación internacional que señala que para lograr efectos positivos en el mantenimiento de la salud, los adultos sanos deberían realizar al menos 30 minutos de actividad física moderada 5 días a la semana, combinando ejercicios de distinta intensidad, para aumentar la respiración y el ritmo cardíaco en forma importante (25).

En los estudiantes de la Universidad del Bio-Bio se encontró que el 58% de los hombres y el 43% de las mujeres realizaban actividad moderada a intensa en la frecuencia y tiempo recomendados. Estos resultados más que duplicaron los de la Encuesta Nacional de Salud 2003 (3), la cual encontró que sólo el 23% de los hombres y el 12% de las mujeres de 17 a 24 años realizaban actividad física 3 veces por semana. Fueron también mayores que los encontrados en estudiantes de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (48,8% en los hombres y 26,1% en las mujeres) (26).

Si bien la proporción de estudiantes hombres que realizaban actividad física fue semejante a la encontrada en Santiago (10), esta proporción fue superior en las estudiantes de la Universidad del Bio-Bio. Cabe señalar que tanto los estudiantes de Santiago (10) como los de Valparaíso (25) señalaron como principales barreras para realizar actividad física de acuerdo a lo recomendado la falta de tiempo, el llegar muy cansado/as de la universidad, por flojera o falta de motivación.

Con respecto al control del peso, al igual que los resultados obtenidos con los estudiantes de Santiago (10) se encontró que a pesar de tener mayoritariamente un estado nutricional normal, una alta proporción manifestó su interés por bajar o mantener su peso.

En este contexto, si bien sólo el 5% de estudiantes universitarios ha logrado alcanzar la meta de consumir las 5 porciones de frutas y verduras al día y hay un 42% de los hombres y un 57% de las mujeres que no están realizando actividad física, la gran proporción que manifestó interés en bajar o al menos no subir de peso abre interesantes posibilidades para mejorar las condiciones ambientales que permitirían lograr cambios positivos en las conductas de este grupo de población. Para ello es necesario que la Universidad se comprometa no sólo con la promoción de estilos de vida saludables, sino también con la implementación de una mayor oferta de frutas y verduras en la cafetería, así como de espacios físicos y de tiempo para la realización de actividad física, que permitan a los estudiantes mejorar su propia calidad de vida y transformarse en promotores de estas conductas saludables en su entorno familiar y futuro laboral.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue posible gracias al apoyo del programa de la Universidad del Bio-Bio, denominado “UBB, transitando hacia una Universidad Saludable”, y de la colaboración de las Tesisistas: Kareen Llanos, Marcela Molina, Ivette Rebeco, Karen Guzmán, Joojhanna Monroy y Anyela Reyes, de la Escuela de Nutrición y Dietética y Tamara Pardo, de la Carrera de Ingeniería Estadística de la Universidad del Bio Bio.

## REFERENCIAS

1. Albala C, Vio F, Kain J, Uauy R. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences. *Public Health Nutr* 2002; 5(1A):123-128.
2. Ministerio de Salud. III Encuesta Nacional de Salud. Santiago: MINSAL; 2003.
3. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO; 1998.
4. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva; WHO: 2003. (WHO Technical Report Series 916).
5. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. 57ª Asamblea Mundial de la Salud. WHA57.17. Ginebra: OMS; 2004.
6. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC; WCRF, AICR: 2007.
7. Ministerio de Salud. II Encuesta Nacional de Calidad de Vida. Santiago: MINSAL; 2006.
8. Olivares S, Bustos N. Consumo de verduras y frutas en grupos específicos de consumidores chilenos: elementos a considerar en su promoción. *Rev Chil Nutr* 2006; 33 (1): 260-264.

9. Olivares S, Bustos N; Lera L. Estado nutricional, consumo de alimentos y actividad física en escolares mujeres de diferente nivel socioeconómico de Santiago de Chile. *Rev Méd Chile* 2007; 135: 71-78.
10. Olivares S, Lera L, Bustos N. Etapas del cambio, beneficios y barreras en actividad física y consumo de frutas y verduras en estudiantes universitarios de Santiago de Chile. *Rev Chil Nutr* 2008; 35 (1):25-35.
11. Vio F, Salinas J. Promoción de salud y calidad de vida en Chile: una política con nuevos desafíos. *Rev Chil Nutr* 2006; 33(S1): 252-259.
12. Ministerio de Salud/INTA/Depto. Nutrición Universidad de Chile. Guías alimentarias para la población chilena. C Castillo, R Uauy, E Atalah, eds. 1ª ed. Santiago: MINSAL; 1997.
13. Ministerio de Salud/INTA/Vida Chile. Guía para una vida saludable. Guías alimentarias, actividad física y tabaco. Santiago: MINSAL; 2005 (Resolución Exenta N° 459 que aprueba la Norma General N° 76).
14. Ministerio de Salud. Etiquetado nutricional de los alimentos. Santiago: MINSAL; 2006.
15. Ministerio de Salud. Estrategia Global contra la Obesidad (EGO-Chile). Santiago: Ministerio de Salud; 2008. Disponible en <http://www.ego-chile.cl>
16. Vio F, Zacarías I, González D. Implementación de un Programa de promoción del consumo de frutas y verduras. Corporación 5 al Día Chile. En: S Olivares, M Leporati, P Villalobos, L Barría, eds. Contribución de la política agraria al consumo de frutas y verduras en Chile: un compromiso con la nutrición y la salud de la población. Santiago: Ministerio de Agricultura/INTA/ Corporación 5 al Día Chile; 2008.
17. Lange I, Vio F. Guía para universidades saludables y otras instituciones de educación superior. Santiago: Vida Chile/OPS/OMS/INTA/PUC; 2006.
18. Lohman T, Roche A, Martorell R. Anthropometric standarization reference manual. USA: Champaign III Human Kinetics; 1991.
19. Zacarías I, Rodríguez L, Lera L, Hill R, Domper D, González D. Consumo de verduras y frutas en centros de salud y supermercados de la Región Metropolitana de Chile: Programa 5 al día. *Rev Chil Nutr* 2009; 36(2): 159-168.
20. National Institute of Health/National Cancer Institute. 5 a Day for Better Health Program. Washington DC: Government Printing Office-Monograph; 2004.
21. Escobar MC, Olivares S, Zacarías I. Manejo alimentario del adulto con sobrepeso y obesidad. Santiago: Ministerio de Salud; 2002.
22. Rossi J, Rossi S, Velicer W, Prochaska J. To change or not to change: That is the question. In: DB Allison. Handbook of the assessment methods for eating behaviours and weight control related problems. Newbury Park, CA: Sage; 1995. pp 387-430.
23. Guenther PM, Dodd KW, Krebs-Smith SM. Most Americans eat much less than recommended amounts of fruits and vegetables. *J Am Diet Assoc* 2006; 106: 1371-1379.
24. Olivares S, Kain J, Lera L, Pizarro F, Vio F, Morón C. Nutritional status, food consumption and physical activity among Chilean school children; a descriptive study. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58: 1278-1285.
25. Haskell WL, Lee IM, Pate RP, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GB, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health. Updated recommendations for adults from de American College of Sport Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exer* 2007; 39: 1423-1434.
26. MacMillan N. Valoración de hábitos de alimentación, actividad física y condición nutricional en estudiantes de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. *Rev Chil Nutr* 2007; 34(4): 330-336.

Recibido: 30-04-2009

Aceptado: 29-07-2009

## Diseño de un plan HACCP en el procesamiento industrial de sardinas congeladas

Patricia Rosas y Genara Reyes

Departamento de Tecnología de Alimentos, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Boca del Río, Estado Nueva Esparta, Venezuela

**RESUMEN.** El Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP) es un sistema para identificar, evaluar y controlar los peligros relacionados con producción, procesamiento, distribución y consumo a fin de obtener alimentos inocuos. El objetivo de esta investigación fue diseñar un plan HACCP para implementarlo en la línea de sardina (*Sardinella aurita*) entera congelada. La metodología se basó en la evaluación del cumplimiento de los programas pre-requisitos (POES/BPF en estudio previo), aplicación de los principios del HACCP y la secuencia de etapas establecidas por la norma venezolana COVENIN N° 3802. Se efectuaron registros de tiempo y temperatura en cada etapa del proceso. Se determinó histamina mediante VERATOX® NEOGEN. Los resultados mostraron que algunos lotes de sardinas llegaron a la planta con altos registros de tiempo-temperatura, encontrándose hasta 5 ppm de histamina debido a abuso de temperatura durante el transporte. Se propone un plan HACCP con el alcance, selección del equipo, descripción del producto y su uso previsto, diagrama de flujo del proceso, análisis de peligros, identificación de PCC y límites críticos, sistema de vigilancia, acciones correctivas, verificación y registros. Los peligros potenciales hallados fueron el crecimiento de patógenos, presencia de histamina y objetos físicos en las sardinas. Las medidas de control de los PCC se refieren al control de tiempo-temperatura durante el transporte y procesamiento, vigilancia del suministro de hielo y de las condiciones de saneamiento en el proceso.

**Palabras clave:** HACCP, inocuidad, *Sardinella aurita*.

**SUMMARY. Design of a HACCP Plan for the industrial process of frozen sardines.** The Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) is a system to identify, assess and control the hazards related with production, processing, distribution and consumption in order to get safe food. The aim of this study was to design a HACCP plan for implementing in processing line of frozen whole sardine (*Sardinella aurita*). The methodology was based in the evaluation of the accomplishment of the pre-requisite programs (GMP/SSOP in a previous study), the application of the principles of the HACCP and the sequence of stages settles down by the COVENIN Venezuelan standard N° 3802. Time-temperature was recorded in each processing step. Histamine was determined by VERATOX® NEOGEN. Results showed that some sardine batches arrived to the plant with high time-temperature records, finding up to 5 ppm of histamine due to the abuse of temperature during transportation. A HACCP plan is proposed with the scope, the selection of the team, the description of the product and the intended use, the flow diagram of the process, hazard analysis and identification of CCP, monitoring system, corrective actions and records. The potential hazards were identified as pathogen growth, presence of histamine and physical objects in the sardines. The control measures of PCC are referred as control of time-temperature during transportation and processing, monitoring of ice supplies and sanitary conditions in the process.

**Key words:** HACCP, safety, *Sardinella aurita*.

### INTRODUCCION

El HACCP es un sistema preventivo para el control de los peligros (microbianos, químicos y físicos) que afectan la inocuidad de los alimentos (1). En el ámbito internacional este sistema es reconocido como el más eficaz para controlar la aparición de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)(2). En 1997 la FDA lo estableció como obligatorio en EUA, con el fin de asegurar la inocuidad durante el procesamiento de productos pesqueros (3). El consumo de pescados frescos y congelados ha causado un número importante de brotes de ETA relacionados en su mayoría con la presencia de toxinas termoestables (biotoxinas, histamina) (4,5). Reportes de ETA en Venezuela revelan que aproximadamente el 22,10 % es causado por productos

pesqueros, que es el mayor índice con respecto a los demás tipos de alimentos (6). La mayoría de los pescados involucrados son el atún, bonito, pez-espada, sardinas, etc, que han estado expuestos a abusos de temperatura durante su transporte o almacenamiento, en los cuales se ha producido histamina por acción bacteriana (7). Los géneros implicados en la producción de histamina en pescados son *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Plesiomonas*, siendo las mayores productoras las bacterias *Morganella morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia Alves*, quienes pueden producir dicha toxina a temperaturas superiores a 5 °C (8,9).

En la industria pesquera el deterioro de la materia prima está relacionado con una mala manipulación o enfriamiento inadecuado durante el almacenamiento o procesamiento. La actividad microbiana desarrollada en los productos pesqueros

frescos, es la responsable de cambios sensoriales que reflejan el grado de descomposición (10). Se debe aplicar un enfriamiento rápido con hielo molido e inmersión en agua de mar refrigerada, controlar el tiempo y la temperatura desde la captura y mantener la limpieza y saneamiento de las áreas, para evitar la proliferación de bacterias productoras de histamina (11).

Previo a la aplicación del HACCP es necesario cumplir con los programas pre-requisitos, tales como Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES), conforme a los Principios Generales de Higiene de Alimentos del Codex (12).

La implementación del HACCP requiere métodos rápidos y sencillos que puedan aplicarse en línea para vigilar los Puntos de Control Críticos (PCC) (13,14). Una preocupación con los productos a enlatar es lo concerniente a pescados con altos niveles de histidina como atún, bonito, sardina, etc que si son mal manipulados cuando frescos, podrían desarrollar histamina que es termoestable y provocar una intoxicación alimentaria (3). El método rápido VERATOX® NEOGEN (15), empleado para determinar histamina, es un test de inmunoensayo ELISA competitivo y directo que tiene celdas con micro-pozos recubiertos con anticuerpos específicos. Este test determina la concentración de histamina en una muestra al compararse con unos patrones. Se emplea un conjugado que es una histamina enlazada químicamente a una enzima. La histamina libre en la muestra o patrones compite con el conjugado, por los sitios de enlace de los anticuerpos, desarrollándose una coloración azul cuya intensidad es proporcional al conjugado enlazado a los anticuerpos. El color de la muestra se compara con el de los patrones para determinar la concentración de histamina. El objetivo de esta investigación fue diseñar un plan HACCP en la línea de sardina (*Sardinella aurita*) entera congelada.

## MATERIALES Y METODOS

Se analizó el proceso de elaboración de sardina entera congelada de una planta procesadora de productos pesqueros ubicada en la Isla de Margarita, Venezuela. Se diseñó el plan HACCP evaluando cada etapa del proceso productivo (13), se identificaron los peligros y se elaboró la tabla control del plan HACCP según los lineamientos establecidos por COVENIN (2), Codex (16) e ISO 22000 (17). En un estudio previo se evaluaron los prerrequisitos del HACCP, se diseñó un plan de saneamiento según los POES y se implementaron las medidas necesarias para su cumplimiento (18).

### Análisis físico-químicos

Los análisis físico-químicos (registros de tiempo-temperatura, características sensoriales y determinación de histamina) se efectuaron a tres lotes de sardinas frescas de

25000 kg cada uno, en un periodo de tres semanas, realizando un muestreo semanal escogido previamente en fechas aleatorias durante la etapa de recepción en el muelle.

### Registros de tiempo y temperatura en diferentes etapas del proceso

Los registros se efectuaron cada hora desde la carga del barco hasta llegar al muelle, luego cada 10 minutos desde la recepción de las sardinas en el muelle (aun en cavas del barco) hasta el paletizado y almacenamiento del producto terminado. El tiempo se midió con un reloj cronómetro manual y la temperatura con un termómetro digital modelo DT-625, para lo cual se introdujo la varilla desde el extremo dorsal de la cabeza, procurando tocar la espina dorsal del pescado.

### Análisis sensorial

El análisis sensorial de la sardina se realizó siguiendo los criterios de frescura de Huss (10).

### Determinación de histamina

Los registros de temperatura de la sardina recibida en el muelle y los resultados del análisis sensorial, fueron los criterios empleados para decidir si era necesaria la determinación de histamina, la cual se realizó según el método VERATOX NEOGEN (15). Para la extracción de la muestra se tomaron tres pescados lavados y eviscerados por triplicado, se cortaron transversalmente piezas musculares de 10 g y se homogeneizaron con 90 ml de agua destilada en licuadora Osterizer por 20 s. La mezcla se filtró utilizando papel Whatman N° 1 y con una micro-pipeta Clinipet se tomaron 100 µL del filtrado, se mezclaron con 10 ml de solución tampón (cloruro de sodio 20,16% y fosfato de sodio 3,5%) agitándose suavemente. Luego se colocaron 100 µL de esta muestra por duplicado y 100 µL de cada patrón con concentraciones de histamina entre 0 ppm a 50 ppm, en las respectivas celdas de mezclado del kit de análisis. Luego se agregó 100 µL del conjugado a cada una de las celdas, se mezcló y se transfirieron 100 µL de cada celda con las mezclas anteriores a nuevas celdas que tienen los micro-pozos con los anticuerpos y se incubaron por 10 min a 25 °C. Se desechó el contenido de las celdas, se lavó cada una con agua destilada y se secó el líquido remanente con papel absorbente. Se añadieron 100 µL del sustrato a cada una de las celdas con anticuerpos (conjugado + muestra ó conjugado + patrón) y se incubaron por 10 min. Durante la incubación, el color azul se desarrolla en proporción a la cantidad de conjugado enlazado en los micro-pozos. A mayor cantidad de conjugado enlazado, indicará que hay menos histamina presente. Finalmente se evaluó el cambio de color de la muestra con respecto a cada uno de los patrones empleados.

### **Aplicación de los Principios del HACCP**

Se comenzó por la descripción de los términos de referencia, selección del equipo HACCP dentro de la planta, la descripción del producto y el uso esperado, la elaboración y validación del diagrama de flujo en planta como pasos preliminares al análisis de peligros, según secuencia recomendada (2).

### **Análisis de peligros y determinación de medidas de control (Principio 1)**

La identificación de los peligros (físico, químico o biológico) se realizó mediante observaciones y registros en cada etapa del proceso. La significancia de los peligros se determinó evaluando las características intrínsecas del producto, proceso, manipulación, diseño y saneamiento de la planta, equipos, empaçado, salud y educación del personal, condiciones de almacenamiento, uso propuesto y tipo de consumidor, etc.

### **Determinación de los PCC (Principio 2)**

La determinación de los PCC se efectuó mediante la aplicación del árbol de decisión (2).

### **Determinación de límites críticos en cada PCC (Principio 3)**

Los límites críticos se establecieron en función de la tolerancia de cada PCC de acuerdo a los parámetros de tiempo-temperatura del proceso, calidad sensorial de la materia prima y del producto en proceso, la presencia de objetos extraños y los criterios de inocuidad para el producto y proceso según las normas establecidas por el Codex (19, 20), COVENIN (21) y FDA (22).

### **Vigilancia (Principio 4)**

Se realizó por medición del tiempo-temperatura en el proceso y observación del cumplimiento de BPF y POES. Se elaboraron planillas para cada PCC, donde se indicó qué, cómo, frecuencia y responsable.

### **Acciones correctivas (Principio 5)**

Se determinaron las acciones correctivas en caso de existir una tendencia hacia la pérdida de control.

### **Verificación del sistema HACCP (Principio 6)**

Es la comprobación *in situ* de la documentación plasmada, registros, inspecciones y pruebas microbiológicas para evaluar el funcionamiento del plan HACCP.

### **Documentación (Principio 7)**

Los registros incluyen la descripción del producto y uso propuesto, esquema tecnológico del proceso señalando los peligros, PCC, medidas de control, límites críticos, sistema de vigilancia, acciones correctivas y procedimientos de verificación del sistema HACCP.

## **RESULTADOS**

La investigación abarcó desde la recepción del pescado fresco en el muelle, traslado a la planta y procesamiento hasta su salida de planta. El equipo HACCP fue conformado por el Presidente de la empresa (Coordinador HACCP), Coordinador de Control de Calidad (jefe del equipo), Coordinador de Compras, un Supervisor de BPM y POES y el Jefe de Mantenimiento. El producto fue definido como bloques de sardinas enteras congeladas de 15 kg y 20 kg, con el 95 % de las sardinas con una talla mayor que 17 cm. Los bloques se mantuvieron congelados con una temperatura interna menor que  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El uso esperado del producto es para procesamiento industrial (materia prima para enlatadoras) con una vida útil de 6 meses almacenado a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El diagrama de flujo del proceso se describe a continuación. Las sardinas venían almacenadas en la cava del barco en una proporción agua de mar:hielo:pescado de 1:3:6 y eran recibidas en el muelle a una temperatura entre  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se transportaban hasta la planta en un tiempo máximo de 90 min y mantenidas a una temperatura máxima de  $4,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En esta etapa de recepción se hacían determinaciones de histamina, evaluación sensorial y pruebas de cocción. Una vez en la planta las sardinas eran lavadas y seleccionadas en función de la talla (un máximo de 5% del lote menor de 17 cm) y daños físicos. El lavado se efectuaba en recipientes con agua clorada (máx 5 ppm de cloro libre) y hielo en proporción 1:1. Seguidamente las sardinas se pesaron para formar bloques al peso requerido, los cuales eran congelados en cavas cuartos a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un tiempo mínimo de 16 h. Los bloques congelados se colocaban en bolsas de polietileno, selladas manualmente, colocadas en paletas y almacenadas en una cava a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Análisis físico-químicos**

En la Tabla 1 se observan las temperaturas máximas registradas, las características sensoriales, tallas de los lotes estudiados y la determinación de histamina.

### **Análisis de peligros y determinación de medidas de control (Principio 1) y determinación de los PCC (Principio 2)**

En la Tabla 2 se visualizan los peligros físicos, químicos y microbiológicos, las medidas de control para los peligros identificados en cada etapa del proceso y los PCC en cada etapa del proceso.

### **Determinación de límites críticos (Principio 3), vigilancia (Principio 4), acciones correctivas (Principio 5), verificación (Principio 6) y documentación (Principio 7)**

En la Tabla 3 (tabla control del plan HACCP) se incluyen los PCC y los peligros significativos, los límites críticos, la vigilancia, las acciones correctivas, los procedimientos de comprobación y la documentación para sustentar los controles del plan.

TABLA 1

Registro de tiempo-temperatura, características sensoriales, tallas y nivel de histamina de lotes de sardinas mantenidas en las cavas del barco para su recepción por la planta

Nº lote	Tiempo de trayectoria maritime	Tº máxima registrada (°C)	Características sensoriales	Características de talla	Histamina (ppm)
1	6 h	4,0	Óptimas	2,5 % < 17 cm 97,5 % > 17 cm	N. D.
2	7 h	2,5	Óptimas	7 % < 17 cm 93 % > 17 cm	N. D.
3	10 h	7,0	Buenas	10 % < 17 cm 90 % > 17 cm	5 ppm

N.D= No detectado

Requisitos: Nivel exigido de histamina en pescado fresco: 50 ppm (FDA), 100 ppm (Codex Stand 36).

Nivel máx. histamina permitido en productos terminados: 200 ppm en sardina enlatada (Norma COVENIN 1087 y Codex Stan 94).

TABLA 2

Análisis de peligros: sardina entera congelada

Ingrediente / Etapa del proceso	Identifique los peligros potenciales, asociados con esta etapa	¿Es el peligro identificado, significativo para la inocuidad del alimento?	Justifique su decisión	¿Qué medidas pueden aplicarse para el control de los peligros?	¿Es este paso un PCC? (Si/No)
RECEPCIÓN DE SARDINAS EN EL MUELLE	Biológicos: -Presencia de Patógenos.	SI	-Presencia de flora patógena proveniente de costas contaminadas como algunos vibrios o enterobacterias.	-Prevenir la captura en costas contaminadas.	NO
	-Químicos: -Desarrollo de Histamina. -Contaminación con lubricantes y/o combustible.	SI	-Histamina se desarrolla a temperaturas > 4,0 °C por 4 h -8 h acumuladas, una vez producida no se elimina por tratamiento posterior.	-Suministrar suficiente hielo para enfriar las sardinas < 4,0 °C desde la captura hasta la recepción en el muelle.	SI
		NO	-Poca probabilidad de producirse este tipo de contaminación.	-Prevenir la captura en costas contaminadas.	NO
	Físicos: -Presencia de objetos, madera, vidrio, metales, etc.	SI	-Los objetos extraños, pueden no detectarse en esta etapa y representan riesgo a la salud del consumidor.	-Extracción manual de objetos no característicos en la materia prima, detectables a simple vista	NO
TRANSPORTE DE LAS SARDINAS A LA PLANTA.	Biológicos: -Crecimiento de patógenos, debido a enfriamiento insuficiente y manipulación.	SI	-Desarrollo de microorganismos en la materia prima sin hielo y producción irreversible de histamina, lo que representa un riesgo a la salud.	-Suministro de hielo para enfriar la sardina. Manipulación cuidadosa para evitar roturas de vísceras y exposición de patógenos.	NO
	Químicos: -Desarrollo de histamina.	SI	-Desarrollo de histamina por retrasos (>90 min) y temperaturas (>8 °C) en el traslado de las sardinas (enfriadas con el mismo hielo colocado durante la travesía en el barco) en camiones hasta la planta.	-Control de temperatura, evaluación propiedades sensoriales de la sardina recibida en planta. -Minimizar el tiempo de recepción de las sardinas en la planta (≤ 90 min)	NO
	Físicos: -Presencia de objetos, madera, vidrio, metales etc.	SI	-Los objetos extraños representan riesgo a la salud del consumidor.	-Serán extraídos en la etapa de selección.	NO
RECEPCIÓN DE SARDINAS EN LA PLANTA.	Biológicos: -Crecimiento de patógenos por enfriamiento insuficiente. -Contaminación bacteriana por equipos, operarios o prácticas no higiénicas.	SI	-Los microorganismos ocasionan ETA, la sardina debe llegar refrigerada a la planta para evitar multiplicación de patógenos.	-Prever el nivel adecuado de hielo para enfriar el pescado mientras se efectúa la carga. Evitar retrasos > 1 h en la carga y traslado hasta la planta. -BPF y POES.	

	Químicos: -Desarrollo de histamina.	SI	-Desarrollo de histamina por demoras (> 1 h) y temperatura (> 4 °C) en el traslado de las sardinas en camiones hasta la planta.	-Control de temperatura, evaluación propiedades sensoriales de la sardina. -Minimizar el tiempo en la carga y traslado a la planta (≤ 90 min).	SI
	Físicos: -Presencia de objetos, madera, vidrio, metales etc.	SI	-Los objetos extraños representan riesgo a la salud del consumidor.	-Serán extraídos en la etapa siguiente de selección.	NO
LAVADO Y SELECCIÓN DE LAS SARDINAS.	-Biológicos: -Contaminación de las sardinas con el agua del lavado.	SI	-Presencia de flora patógena en el agua y en el hielo de enfriamiento, tales como vibrio, enterobacterias, etc., que pueden causar ETA.	-Correcta aplicación del POES N° 1, en cuanto al saneamiento del agua.	NO
	-Químicos: -Exceso de cloro libre residual en las sardinas.	SI	-El exceso de cloro residual en los alimentos tiene efectos tóxicos en el organismo (máx. 5 ppm).	-Correcta aplicación de POES.	NO
	-Físicos: -Presencia de objetos, sardinas rotas y otras especies.	NO	-Exclusión de objetos extraños, sardinas rotas, especies no características, son medidas de control del proceso.	-Mantener el control de parámetros durante el proceso.	NO
PESADO DE LAS SARDINAS.	-Biológicos: -Presencia de patógenos en las sardinas.	NO	-Escasa manipulación de la sardina en esta etapa ya que pasa inmediatamente a los túneles de congelación.	-Aplicación de BPF.	NO
	-Químicos: -Inexistente.	NO	-----	-----	NO
	-Físicos: -Inexistente.	NO	-----	-----	NO
CONGELADO	-Biológicos: -Ninguno	NO	-----	-----	NO
	-Químicos: -Oxidación de lípidos.	SI	-Oxidación de lípidos origina cambios de sabor, olor y color, generando productos tóxicos y deteriora la calidad.	-Etapa de congelación debe ser entre 18 h a 36 h y temperaturas entre -25 °C a -28 °C. -Empaque debe evitar la deshidratación y oxidación de la sardina.	NO
	-Físicos: -Ninguno.	NO	-----	-----	NO
EMBOLSADO DEL BLOQUE.	-Biológicos: -Presencia de tóxicos y/o patógenos en el material de empaque.	SI	-Contaminación del material de empaque con lubricantes, patógenos, etc. que ocasionarían efectos adversos al consumidor.	-Controlados por aplicación de POES N°5.	NO
	-Físicos: -Presencia de alambres de amarrar en el producto terminado, debido a incorrecta manipulación en esta etapa.	NO	-Los objetos extraños representan riesgo a la salud del consumidor.	-Aplicar correctamente las BPF y POES.	NO
	-Químicos: -Ninguno.	NO	-----	-----	NO
PALETIZADO Y ALMACENAMIENTO.	-Biológicos: -Contaminación del producto terminado con patógenos por ruptura del empaque durante el paletizado.	SI	-Los microorganismos patógenos presentes en las superficies de las paletas, el suelo, en contacto con el alimento, pueden ocasionar ETA.	-Precaución al manipular las bolsas y las paletas con el montacargas. -Aplicación correcta de POES N° 5.	NO
	-Físicos: -Ninguno.	NO	-----	-----	NO
	-Químicos: -Ninguno.	NO	-----	-----	NO

TABLA 3  
Plan de HACCP: Sardina entera congelada

Punto de control crítico	Peligro significativo	Límites críticos	¿Qué?	¿Cómo?
PPC 1 RECEPCIÓN DE LAS SARDINAS EN EL MUELLE.	-Desarrollo de histamina en la especie <i>Sardinella aurita</i> desde la travesía en el barco hasta la recepción en el muelle.	-Temperatura en el agua $\leq 3,0$ °C. -Temperatura en la sardina $\leq 4,4$ °C. -Tiempo de travesía $\leq 12$ h. -Nivel de histamina máximo permitido 10 mg/ 100 g.	-Tiempo y temperatura agua-sardina durante la travesía y al momento de la descarga en el muelle.	-Toma de temperatura a la sardina y al agua de la cava del barco.
PCC 2 TRANSPORTE DE LAS SARDINAS A LA PLANTA.	-Desarrollo de histamina en la especie <i>Sardinella aurita</i> durante el tiempo de carga de los camiones, transporte y descarga.	-Nivel de histamina permitido $\leq 10$ mg/100 g -Tiempo máximo 1 h de carga, transporte y descarga de las sardinas en planta.	Temperatura y evaluación sensorial de la sardina al ser cargadas y recibidas en planta.	-Toma de temperatura en la carga y descarga.
PCC 3 RECEPCIÓN DE LAS SARDINAS EN LA PLANTA.	-Desarrollo de histamina en la especie <i>Sardinella aurita</i> durante el tiempo de recepción en la planta.	- Nivel de histamina permitido $\leq 10$ mg/100 g -T° máx. de la sardina: 4 °C. -tiempo máximo de ejecución de esta etapa: 1 h.	Temperatura y análisis sensorial de la sardina recibida en planta.	-Toma de temperatura y evaluación sensorial de la sardina fresca y luego de una prueba de cocción.
Vigilancia ¿frecuencia?	¿Quién?	Acciones correctivas	Verificación	Registro
-Medición cada hora o 1 ½ hora durante el trayecto y arribo a muelle y antes de comenzar la descarga.	-Capitán responsable de la carga en el barco.	-Suministro suficiente de hielo para el enfriamiento de la sardina en proporción 1:3:6 agua: hielo: sardina (10-12 t) hielo en cava + 4 Tn de reserva para trayecto largos. -Recirculación correcta del sistema de enfriamiento. -Rechazo de lotes con nivel de histamina $>10$ mg/ 100 g	-Revisión diaria del registro de temperaturas tomadas durante el trayecto en el barco y toma de temperatura <i>in situ.</i> , antes de cada descarga en muelle. -Calibración de termómetros. -Determinación de histamina en caso de registrar abusos de temperaturas en la travesía.	-Planilla de control de temperatura durante la travesía en el barco. -Registro de temperatura sardina- agua en el muelle. -Reporte de determinación de histamina. -Registro de suministro de hielo empleado en el proceso.
En cada carga de camión, transporte y descarga en planta.	-Jefe de control de calidad y/o supervisores delegados y jefe de mantenimiento.	-Prever la reserva de hielo en el estibado de las sardinas dentro del camión. -Minimizar el tiempo de carga y traslado hasta la planta. -Planificar operaciones de contingencia ante fallas mecánicas de los camiones.	-Revisión de registros de temperatura antes de la carga en muelle. -Control del hielo de reposición en muelle. -Supervisión de BPF y POES. -Control de tiempo en el transporte.	-Registro de tiempo y temperatura de la sardina en la carga y descarga de camiones
-Diaria en cada lote de materia prima recibida por cada barco descargado.	-Jefe de control de calidad y/o supervisores delegados.	-Evitar temperaturas en la sardina $>4$ °C, y tiempos de descarga $>1$ h permitirían producción de histamina. -Rechazo de lote con nivel de histamina $> 10$ mg/ 100g.	-Determinación de histamina en la sardina. -Revisión de registros de T° y t' durante la carga y descarga de sardinas en la planta.	-Registro de características de sardina fresca -Reporte de histamina.

NOMBRE DE LA COMPAÑÍA: XX  
DIRECCIÓN: Isla de Margarita –VENEZUELA.  
Firma: Responsable HACCP.  
Aprobado Gerente General.

Descripción del Producto: Sardinas enteras congeladas, presentadas como bloques de 15 kg y 20 kg en bolsas plásticas cerradas.  
MÉTODO DE ALMACENAMIENTO: Mantener congelado a -18 °C.  
USO PROPUESTO Y CONSUMIDOR FINAL: Producto destinado al procesamiento industrial (conservas) para consumo humano.

## DISCUSION

### Registro de tiempo y temperatura en diferentes etapas del proceso

El tiempo transcurrido desde la captura, almacenamiento en el barco y transporte hasta el muelle de descarga, varió entre 3 h a 10 h. Al momento de la descarga en el muelle, las sardinas capturadas en caladeros del Edo. Nueva Esparta (lotes 1 y 2) alcanzaron temperaturas entre 2,5 °C y 4,0 °C en las cavas de los barcos y el agua de enfriamiento registró temperaturas entre 1 °C y 2 °C, considerándose adecuada la reposición de hielo. En las sardinas traídas desde el Edo. Sucre (lote 3) las temperaturas al momento de descarga fueron mayores de 5,0 °C con tiempos de traslado de hasta 10 h. Según la FDA (2008)(22) si el almacenamiento refrigerado del pescado se prolonga de 4 h a 8 h, las temperaturas deben ser menores a los 4,0 °C. De los lotes analizados, el lote 3 no cumplió con este criterio. Adicionalmente, la FDA ha establecido las siguientes medidas de control para prevenir el desarrollo de histamina: a) El pescado fresco no debe permanecer por más de 4 h (acumuladas) a temperaturas mayores de 4 °C, si en algún momento el pescado ha estado expuesto a temperaturas mayores de 21 °C. b) El pescado fresco no debe permanecer expuesto por más de 8 h (acumuladas) a temperaturas mayores de 4 °C, siempre y cuando ninguna porción del pescado haya superado los 21 °C.

### Análisis físico-químicos

En la Tabla 1 se observa que la talla de más del 90% de las sardinas estudiadas fue mayor de 17 cm, cumpliendo con la regulación nacional establecida para esta especie (23). Se aprecia que el lote 3 registró una temperatura máxima de 7,0 °C y un tiempo de trayectoria marítima de 10 h, el análisis sensorial arrojó olor a algas marinas, pérdida de escamas, branquias rojas pálidas, buenas condiciones de frescura en general, sin embargo se determinó el nivel de histamina, debido a exceso en los límites de tiempo y temperatura establecidos por la FDA (2008) (22). El nivel de histamina hallado es menor al límite máximo de 50 ppm establecido por la FDA (22). También es menor al límite que señala el CODEX STAN (19) para pescados a congelar, CODEX STAN (20) para sardina enlatada y COVENIN (21). Las características sensoriales señaladas y el valor de histamina, evidencian fallas en el sistema de enfriamiento durante el trayecto del barco hasta el muelle de recepción.

### Análisis de peligros y determinación de medidas de control (Principio 1)

En la Tabla 2, se observan los peligros identificados en cada una de las etapas del proceso, éstos se refieren al crecimiento bacteriano autóctono (*Clostridium* y *Vibrios*) y consecuente desarrollo de histamina en la sardina por un

enfriamiento deficiente y/o exceso de manipulación; también se refieren a la presencia de objetos extraños, exceso de cloro en el lavado, contaminación bacteriana (de la familia de las Enterobacterias) y química, cuyas medidas de control consisten en la regulación del tiempo y la temperatura del proceso y en el cumplimiento de los programas prerequisites. En este sentido, (5) indica que generalmente los peligros potenciales en los productos pesqueros están asociados con abusos de tiempo y temperatura durante el almacenamiento, que permiten deterioro temprano en la materia prima por acción bacteriana y por manipuleo en el proceso, así como el crecimiento de patógenos. Cabe mencionar, que la producción bacteriana de histamina en sardinas, representa un peligro significativo, ya que es frecuente hallar altos niveles de histamina en lotes que han sufrido abusos de temperatura (mayor de 4 °C) por más de 8 h durante su transporte o almacenamiento, que luego han sido implicados en ETA (7).

### Determinación de los puntos de control crítico (Principio 2)

En la Tabla 3, luego de aplicar el árbol de decisión, se muestran los PCC asociados a las etapas de recepción en el muelle, transporte a la planta y recepción en planta. La principal medida preventiva consiste en el control de tiempo-temperatura en las etapas con alta probabilidad de crecimiento bacteriano. La temperatura es el factor individual más importante que influye en el crecimiento bacteriano y en la rapidez del deterioro del pescado. En el caso de especies proclives a la producción de histamina, el control del tiempo-temperatura puede ser el método más eficaz para garantizar la inocuidad del pescado, por lo cual éste debe mantenerse lo más cercano a 0 °C (24).

### Determinación de límites críticos (Principio 3), vigilancia (Principio 4), acciones Correctivas (Principio 5), verificación del sistema HACCP (Principio 6) y documentación (Principio 7)

En la Tabla 3 se especifican los PCC, los peligros significativos y los límites críticos, los cuales se establecieron para controlar el nivel de histamina mediante las condiciones de tiempo y temperatura según los valores de referencia señalados (19, 20, 21, 22). Para establecer la tolerancia de los límites críticos de cada etapa y PCC, se aplicó la relación definida por COVENIN (2002) (2), mediante los datos registrados de tiempo y temperatura tomados durante la investigación, las características del sistema de almacenamiento en el barco, transporte y recepción. El sistema de vigilancia implica evaluación del tiempo, la temperatura y las condiciones sensoriales de las sardinas en los PCC, lo que evitará proliferación de bacterias productoras de histamina. Se comprueba que el sistema HACCP opera efectivamente mediante revisión integral del plan, evaluación de los registros de las correcciones, desviaciones, gráficos de tiempo-

temperatura y la frecuencia. El plan HACCP y los registros correspondientes deben ser archivados en la planta. El equipo HACCP debe mantenerse actualizado en los reglamentos y normas establecidas, con el fin de detectar cualquier cambio de los requisitos utilizados como referencia en el proceso o producto.

### CONCLUSIONES

Los registros mostraron abusos de temperatura y retrasos durante el transporte de la sardina a la planta, con tendencia al aumento del nivel de histamina. Los peligros potenciales significativos para la inocuidad del alimento fueron: el crecimiento de patógenos por contaminación, manipulación y enfriamiento insuficiente, desarrollo de histamina, exceso de cloro libre, entre otros. Se definieron como PCC las etapas de recepción en el muelle, el transporte y la recepción en planta, donde el peligro de mayor probabilidad de ocurrencia es el crecimiento de patógenos por enfriamiento inadecuado con producción irreversible de histamina en la sardina y pérdida de calidad. Las principales medidas de control son: revisión de tiempo-temperatura en el transporte, suministro de hielo y cumplimiento de las medidas de control sanitario.

### REFERENCIAS

- Alianza Nacional de HACCP para Pescados y Mariscos (ANHPM). 4ª Ed. Reporte 125. Florida: Florida Sea Grant; 2004.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Directrices generales para la aplicación del sistema HACCP en el sector alimentario. Norma 3802. Caracas: FONDONORMA; 2002.
- Institute of Food Technologists (IFT)/Food & Drug Administration (FDA) Report. Analysis of microbial hazards related to time/temperature control of foods for safety. *Comprehensive Rev Food Sci & Food Safety* 2003; Vol. 2 (supplement): 33-41.
- Newsome R. 1995. Science communications proposed regulations for HACCP Activities. *Food Technol.* 1995; 49: 32-39.
- Huss HH. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. Documento Técnico de Pesca N° 348. Roma: FAO; 1997.
- Panalimentos. Sirvieta. 2005. [Página web en línea]. Disponible en: [www.panalimentos.org/sirvieta](http://www.panalimentos.org/sirvieta).
- Chang SH, Kung HF, Chen HC, Lin CS, Tsai YH. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets implicated in a food borne poisoning. *Food Control* 2008; 19:16-21.
- Izquierdo P, Allara M, Torres G, Fernández A, Paulin Kevicius M, Fuenmayor. Bacterias productoras de histamina en tres especies de pescado. *Revista Científica FCV-LUZ* 2001; XI: 431-435.
- Fernández A. Recopilación de informes científicos. Proyecto TCP/PER/8924. Convenio MIPE/ITP/FAO. 2002. [Página web en línea]. Disponible: <http://tarwi.lamolina.edu.pe>
- Huss HH. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Documento Técnico de Pesca N°334. Roma: FAO; 1998.
- Chimpen L. Procesamiento de productos pesqueros. XIII Curso Internacional de Tecnología de Procesamiento de Productos Pesqueros. Callao: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú; 1997.
- Comisión del Codex Alimentarius. Código Internacional de Prácticas Recomendado-Principios Generales de Higiene de los Alimentos CAC/RCP 1-1969, Rev 4. 2003.
- Mortimore S, Wallace C. HACCP: Un enfoque práctico. Zaragoza: Editorial Acribia; 1996.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación a las industrias de alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia; 1991.
- Neogen Corporation. Food safety catalog. Lansing, MI, USA; 2005.
- Comisión del Codex Alimentarius. Directrices para la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Anexo CARC/RCP 1-1969, Rev.4. 2003.
- International Standardization Organization (ISO)/Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos- Requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria. Norma 22000. Caracas: FONDONORMA; 2005
- Rosas P, Reyes G. Evaluación de los programas pre-requisitos del plan HACCP en el procesamiento industrial de sardinas congeladas. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 2008; 58:174-181.
- Comisión del Codex Alimentarius. Norma para pescados no eviscerados y eviscerados congelados rápidamente. *Codex Stan* 36; 1981. Rev. 1-1995.
- Comisión del Codex Alimentarius. Norma para sardina y productos análogos en conserva. *Codex Stan* 94; 1981.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Determinación de histamina en sardinas en conserva. Norma 1087. Caracas: FONDONORMA; 1998.
- Food & Drug Administration. Scombrotoxin (histamine) formation. Fish and Fisheries products hazard & control guides. [Página web en línea]. 2008. Disponible: <http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/Chapt27.htm>
- Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Tierras. Providencia Administrativa N° 08-2004, Enero 09.
- Comisión del Codex Alimentarius. Código de Prácticas para Pescado y Productos Pesqueros. CAC/RCP 52. Roma: FAO/OMS. 2003.

Recibido: 15-09-2008

Aceptado: 22-06-2009

## Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicum esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia, Venezuela

Luis Guillermo Ramírez Mérida, Alba Morón de Salim, Ana Yudith Alfieri Graterol y Orlando Gamboa

Universidad de Carabobo, Valencia y Facultad de Ingeniería de Alimentos, Canoabo,  
Universidad Simón Rodríguez, Venezuela

**RESUMEN.** Se determinó la frecuencia de *L. monocytogenes* en tomates y cilantro, de tres diferentes supermercados, ubicados en el Municipio Valencia, Estado Carabobo, durante ocho semanas. Se evaluaron 192 muestras: 96 de tomates y 96 de cilantro. Procesamiento y análisis microbiológico, según Normas Industriales COVENIN 3718:2001. Paquete estadístico SPSS versión 12.0. Se aplicó prueba de Kolmogorov Smirnov, test de U Mann Whitney y Kruskal Wallis y correlación de Spearman. Nivel de significancia ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los valores medios y desviación estándar en el número del Numero Mas Probable (NMP) de *Listeria spp* para tomates y cilantro, durante las ocho semanas de recolección en los tres supermercados; ni tampoco entre las distribuciones de NMP en tomates y cilantro de los tres supermercados ( $\chi^2=5,233$   $p < 0,073$ ;  $\chi^2=1,624$   $p < 0,444$  respectivamente); ni entre las muestras por semana ( $\chi^2=6,547$   $p < 0,477$ ;  $\chi^2=2,667$   $p < 0,914$  respectivamente). Se encontró diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ), en las diferencias de distribución de NMP entre tomate y cilantro y en el número de NMP entre tomates y cilantro ( $p < 0,001$ ). La presencia de *Listeria spp* en tomate fue 41,66% (25,0% *L. monocytogenes* y 16,7% *L. ivanovii*); en cilantro 77,08% (36,5% *L. monocytogenes*, 33,3% *L. ivanovii*, 7,3% *L. seeligeri*). Se concluye que el elevado porcentaje encontrado de *L. monocytogenes* en tomates y cilantro, es independiente del supermercado de expendio; se evidencia la necesidad de un control microbiológico a nivel del sistema de riego, recolección y distribución, para asegurar la calidad del producto.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, vegetales frescos tomates, cilantro, control microbiológico.

### INTRODUCCION

La mayoría de los vegetales de consumo habitual pueden presentar contaminación bacteriana y por ende ser vehículos de enfermedades y portadores de agentes infecciosos como *Listeria monocytogenes* (1). Entre los alimentos de origen vegetal involucrados están: tomates, cilantro, céleri, coliflor, espárragos, brócoli, repollo y lechuga, existiendo dentro de la demanda de vegetales mínimamente procesados, incrementada

**SUMMARY. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) and coriander (*Coriandrum sativum*) in three markets of Valencia, Venezuela.** The incidence of *L. monocytogenes* in tomatoes and coriander obtained from three different markets, during eight weeks were determined. 192 samples were evaluated: 96 of tomatoes, and 96 of coriander. The isolation of *L. monocytogenes* was performed using COVENIN 3718:2001. The data were analyzed by SPSS version 12.0. Kolmogorov Smirnov, Mann Whitney U, Kruskal Wallis U test; Spearman's correlation were applied, and  $p < 0.05$  significance level was applied. It was not found significant differences between the medias values and standard deviations of Most Probable Number (MPN) of *Listeria spp* to tomatoes and coriander during the eight weeks of recollection in the markets; neither between the distributions of MPN of tomatoes and coriander from the markets ( $\chi^2=5,233$   $p < 0,073$ ;  $\chi^2=1,624$   $p < 0,444$  respectively) neither the samples per weeks ( $\chi^2=6,547$   $p < 0,477$ ;  $\chi^2=2,667$   $p < 0,914$  respectively). In the number of MPN between tomatoes and coriander both distributions were significant different according to test U Mann Whitney  $U=3040,5$  ( $Z=-4,216$   $p < 0,0001$ ). It was found statistical significance ( $p < 0,001$ ) between the number of MPN of tomatoes and coriander. The presence of *Listeria spp* in tomatoes was 41,66% (25,0% *L. monocytogenes* and 16,7% *L. ivanovii*); in coriander 77,08% (36,5% *L. monocytogenes*, 33,3% *L. ivanovii* and 7,3% *L. seelige*). We concluded that the high level of *L. monocytogenes* in tomatoes and coriander is independent of the markets store; we see the necessity of a microbiological control on the irrigation system, collection and distribution to ensure the quality of the product.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, fresh vegetables tomatoes, coriander, microbiological control

por el auge de los servicios de comida rápida como lo son las ensaladas ("salad bar"), aumentando así el riesgo asociado a enfermedades causadas por *L. monocytogenes* (2-4), y/o portadores del patógeno (5,6). La listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria causada principalmente por *L. monocytogenes*, productora de una toxina citolítica y hemolítica, llamada *listeriolisina O*, la cual se secreta a pH bajo y baja concentración de hierro y actúa como un importante factor de virulencia. Aunque se presenta como

casos esporádicos o en brotes a nivel mundial con una tasa de mortalidad cercana al 30%, principalmente entre personas inmunocomprometidas, infantes o mujeres grávidas que son la población de más alto riesgo (7-11); investigadores reflejan porcentajes de hasta 25% de presencia de *L. monocytogenes* en vegetales (12).

En Venezuela se han reportado datos discretos (13-15), más por falta de estudios epidemiológicos, que por ausencia del patógeno. *L. monocytogenes* es un patógeno difícil de controlar en los alimentos vegetales gracias a su capacidad de resistir amplios rango de temperatura, pH y cloruro de sodio (sal). La erradicación completa y definitiva de *L. monocytogenes* en los ambientes de producción de alimentos se considera poco probable, ya que la investigación microbiológica, requiere de períodos de pre-incubación y de incubación, que además de alargar el proceso, no dan una idea de la contaminación inicial. Estudios de los efectos de los diferentes parámetros de procesamiento en la industria, han permitido indagar sobre los factores que contribuyen al desarrollo, supervivencia e inactivación de *L. monocytogenes* (11,16). En el presente trabajo se determinó la prevalencia de *L. monocytogenes* en tomates y cilantro frescos, adquiridos en tres supermercados diferentes ubicados en el Municipio Valencia, durante ocho semanas.

## MATERIALES Y METODOS

Se adquirieron muestras de los dos tipos de vegetales frescos: tomates (grupo 1) y cilantro (grupo 2), de tres cadenas diferentes de supermercados (A, B, C) de Valencia, Venezuela. La recolección se realizó adquiriendo 12 muestras al azar de cada grupo y de cada supermercado por semana, durante ocho semanas, para un total de 96 muestras por grupo. Durante cada semana, las muestras se colocaban en bolsas plásticas estériles, selladas y transportadas en una cava refrigerada al laboratorio de microbiología, para su procesamiento y análisis por duplicado empleando las Normas Industriales COVENIN (17). El aislamiento de *L. monocytogenes* se realizó empleando el método recomendado por la Norma Venezolana (18). Se utilizó Agar PALCAM como medio tradicional selectivo para aislar al microorganismo.

**Preparación de las muestras.** Cada paquete de muestra de tomate y de cilantro frescos fue macerado por trituración y mezclado; de cada uno se pesó 1 g y se mezcló con 9 mL de caldo soya tripticasa al 0,6% de extracto de levadura, para obtener una dilución 1:10. De la dilución 1 en 10, se realizaron diluciones en serie hasta alcanzar la dilución de  $10^{-9}$ . Cada una de las diluciones se incubó a 37°C en estufa por espacio de 6 horas. Luego se tomó 0,1 mL de cada dilución y se sembró en Agar PALCAM por la técnica de difusión en agar con la espátula de Drigalski, se incubó a 37°C y se observó a las 24, 48 y 72 horas para evidenciar el crecimiento del microor-

ganismo, y se procedió a realizar las pruebas de aislamiento e identificación (17, 18).

**Identificación y confirmación de las cepas.** Usando la identificación morfológica de las colonias que crecieron en agar PALCAM, se inocularon aquellas colonias típicas del microorganismo, por estriación con asa de platino en placas de Agar Trypticase Soya con 0,6% de extracto de levadura, incubándose a 37°C por 48 horas, a partir de este cultivo se realizaron: coloración de gram, prueba de movilidad en medio SIM, motilidad en lámina escavada, prueba de hemólisis en agar sangre, prueba de CAMP, prueba de catalasa y el esquema de identificación bioquímica con las pruebas de fermentación de ramnosa, manitol, TSI (lactosa, sacarosa, glucosa) y la prueba de bilis esculina, para la identificación y confirmación de *Listeria spp* (18).

**Análisis estadístico.** Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS versión 12.0 para ambiente Windows. La información se presenta en cuadros de asociación, con frecuencias absolutas, porcentajes, promedios y desviaciones estándar del número de Número Más Probable (NMP) de *Listeria spp*.

La Prueba de Kolmogorov Smirnov realizada a las variables investigadas, no mostró distribución normal. Por tal motivo, las comparaciones de los valores medios entre grupos (supermercados, vegetales, semanas de recolección de las muestras y cepas de *Listeria spp*) se utilizaron para el análisis de los valores del NMP para métodos no paramétricos; test U Mann Whitney y el de Kruskal Wallis, para dos y tres grupos respectivamente. Estas pruebas permiten la comparación de los órdenes que ocupan los valores de las variables en cada grupo investigado. Se aplicó la correlación de Spearman para establecer la asociación ordinal entre el número de los NMP en muestras de los dos vegetales. Criterio de significancia utilizado  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los valores medios y de desviación estándar del número del NMP de *Listeria spp*, de las muestras de tomate y cilantro de los tres supermercados, durante las ocho semanas que duró la recolección. No se encontraron diferencias significativas de los valores promedios entre los supermercados y/o semanas y entre los mismos. No se observaron diferencias significativas entre las distribuciones de NMP en los tomates de los tres supermercados ( $\chi^2=5,233$   $p < 0,073$ ) ni entre las muestras de tomate por semana ( $\chi^2=6,547$   $p < 0,477$ ); igual que para el caso de las muestras de cilantro, los resultados tampoco dieron diferencias significativas entre las distribuciones del NMP de los tres supermercados ( $\chi^2=1,624$   $p < 0,444$ ), ni para el período de recolección muestral ( $\chi^2=2,667$   $p < 0,914$ ).

TABLA 1  
Valores medios y de Desviación Estándar del NMP de *Listeria spp* en muestras de tomate y cilantro según supermercado y semana

Super – Mercados	Semana (c/u: n =4)	Tomate		Cilantro	
		Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
A (n = 32)	1	2,2x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	2,1 x10 <sup>5</sup>	4,2x10 <sup>5</sup>
	2	0	0	1,7x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>5</sup>
	3	0	0	1,2x10 <sup>9</sup>	2,4x10 <sup>9</sup>
	4	2,7x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>3</sup>	2,7x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>3</sup>
	5	2,5x10 <sup>5</sup>	5,0x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>	4,9x10 <sup>5</sup>
	6	3,7x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>3</sup>	3,7x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>3</sup>
	7	0	0	1,9x10 <sup>3</sup>	3,3x10 <sup>3</sup>
	8	1,7x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>4</sup>
	Total	3,7x10 <sup>4</sup>	1,7x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	8,8x10 <sup>8</sup>
B (n = 32)	1	5,7x10 <sup>4</sup>	9,6x10 <sup>3</sup>	2,2x10 <sup>8</sup>	4,4x10 <sup>8</sup>
	2	1,5x10 <sup>6</sup>	2,9x10 <sup>6</sup>	7,5x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>
	3	1,0x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	3,2x10 <sup>5</sup>	4,2x10 <sup>5</sup>
	4	0	0	2,2x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>6</sup>
	5	2,0x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	4,4x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>3</sup>
	6	2,4x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>4</sup>
	7	1,2x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>
	8	2,7x10 <sup>4</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	2,9x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>
	Total	1,9 x10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>
C (n = 32)	1	5,0x10 <sup>5</sup>	9,9x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>
	2	1,6x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>8</sup>	3,9x10 <sup>8</sup>
	3	2,1x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>
	4	2,1x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>
	5	3,7x10 <sup>4</sup>	7,5x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>
	6	3,3x10 <sup>5</sup>	3,9x10 <sup>5</sup>	3,3x10 <sup>5</sup>	3,9x10 <sup>5</sup>
	7	2,4x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>5</sup>	2,4x10 <sup>5</sup>	4,3x10 <sup>5</sup>
	8	0	0	2,7x10 <sup>1</sup>	3,2x10 <sup>1</sup>
	Total	1,4x10 <sup>5</sup>	4,0x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>
Total (n = 96)	1	1,7x10 <sup>5</sup>	5,7x10 <sup>5</sup>	7,5x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>
	2	5,0x10 <sup>5</sup>	1,7x10 <sup>6</sup>	6,9x10 <sup>6</sup>	2,3x10 <sup>8</sup>
	3	7,4x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>9</sup>
	4	8,0x10 <sup>3</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	7,4x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>6</sup>
	5	9,5x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	9,7x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>
	6	1,2x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>5</sup>
	7	8,4x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>	8,5x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>
	8	1,5x10 <sup>4</sup>	2,7x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>
	Total	1,2x10 <sup>5</sup>	6,5x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>7</sup>	5,2x10 <sup>8</sup>

NMP = Número más probable

Con respecto a las diferencias del NMP de *Listeria spp* entre las muestras de tomate y cilantro, se halló que ambas distribuciones difieren significativamente según el test U Mann Whitney,  $U=3040,5$  ( $Z= - 4,216$   $p<0,0001$ ), lo que implica que las distribuciones del NMP fueron diferentes. Al observar los valores promedios, se puede apreciar que hubo mayor número del NMP de *Listeria spp* en las muestras de cilantro que en el tomate.

La correlación de Spearman entre el número de NMP de *Listeria spp* en las muestras de tomates y de cilantro, dio como resultado un coeficiente igual a 0,448 que determina una significación estadística de  $p<0,001$ , demostrando que la presencia de *Listeria spp* en tomate se correlaciona significativamente con la existencia de la misma en el cilantro en el estudio realizado.

La Tabla 2 presenta la presencia de cepas de *Listeria spp* en el total de las muestras de tomates y de cilantros analizadas. Se puede observar que no hubo crecimiento del patógeno en el 58,3% de los tomates y 22,9% del cilantro. De las muestras de tomate donde hubo crecimiento se encontró 25,0% de *L. monocytogenes* y 16,7% de *L. ivanovii*; mientras que en las muestras de cilantro se encontró 36,5% de *L. monocytogenes*,

33,3% de *L. ivanovii* y 7,3% de *L. seeligeri*.

Los valores medios que se muestran en la Tabla 3, sólo corresponden al número del NMP de los cultivos que dieron positivos. Al establecer la comparación ordinal entre la presencia de *L. monocytogenes* en tomate y en cilantro, dio un resultado no significativo ( $U = 392,500$ ;  $Z = -0,425$   $p < 0,671$ ).

TABLA 2  
*Listeria spp* en muestras de tomate y cilantro adquiridas en tres supermercados

Cepas en tomate	Ausente N (%)*	Cepas en cilantro			Total (%)
		<i>L. monocytogenes</i> n (%)*	<i>L. ivanovii</i> n (%)*	<i>L. seeligeri</i> n (%)*	
Ausente	22 (39,3)	14 (25,0)	14 (25,0)	6 (10,7)	56 (58,3)
<i>L. monocytogenes</i>	0 (0,0)	21 (87,5)	2 (8,3)	1 (4,2)	24 (25,0)
<i>L. ivanovii</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	16 (100,0)	0 (0,0)	16 (16,7)
Total	22 (22,9)	35 (36,5)	32 (33,3)	7 (7,3)	96 (100,0)

\* Porcentajes internos en relación a subtotaes horizontales.

TABLA 3  
Valores medios y de desviación estándar del NMP de *Listeria spp* en las muestras de tomate y cilantro según tipo de cepa

Cepas	Tomate		Cilantro	
	Media (n)	Desviación estándar ( $\pm$ DS)	Media (n)	Desviación estándar ( $\pm$ DS)
<i>L. monocytogenes</i>	$1,0 \times 10^5$ (24)	$2,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^8$ (35)	$8,5 \times 10^8$
<i>L. ivanovii</i>	$6,0 \times 10^5$ (16)	$1,5 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$ (32)	$1,5 \times 10^8$
<i>L. seeligeri</i>	—	—	$1,5 \times 10^4$ (7)	$3,3 \times 10^4$
Total	$3,0 \times 10^5$ (40)	$1,0 \times 10^6$	$9,1 \times 10^7$ (74)	$5,9 \times 10^8$

NMP = Número Más Probable

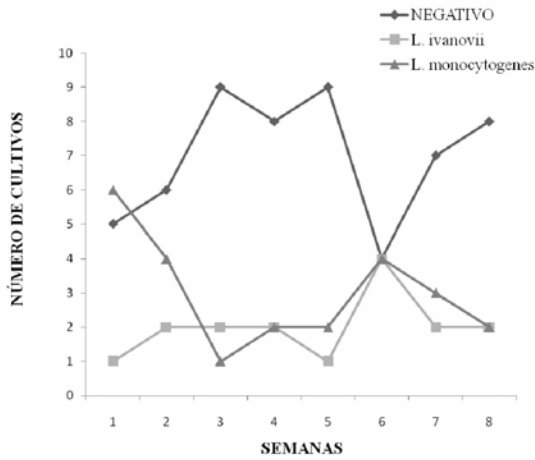
Con respecto a *L. ivanovii* entre ambos vegetales, tampoco dio diferencia entre las dos distribuciones ( $U = 252,500$ ;  $Z = -0,077$   $p < 0,939$ ).

Si se compara dentro de los tomates, la distribución del *L. monocytogenes* con la presencia de *L. ivanovii*, las distribuciones de los valores del NMP no fueron significativamente diferentes ( $U = 169,00$ ;  $Z = -525$   $p < 0,539$ ); mientras que en el caso de las muestras de cilantro, donde se compara la distribución de la data en sentido ordinal de los valores, según las tres especies en los cultivos de *Listeria spp*, se obtuvo un valor de  $\text{Chi}^2 = 3,987$   $p < 0,136$ .

La Figura 1 presenta la distribución de las muestras de tomate ( $n = 96$ ) según el resultado de los cultivos de *Listeria spp* por semana de recolección. Se puede observar que

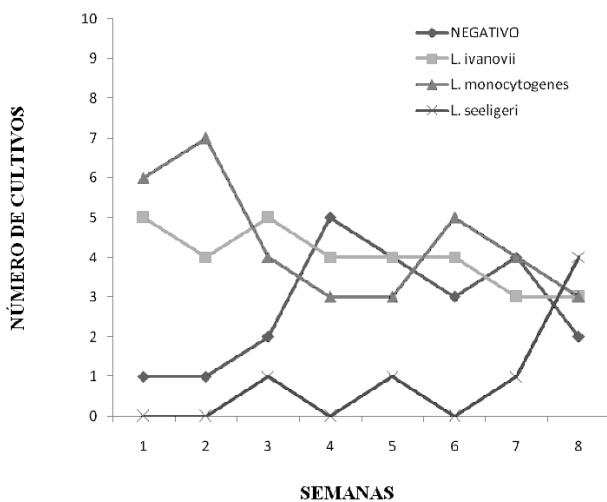
durante las cinco primeras semanas no hubo crecimiento del patógeno, en comparación con la sexta semana donde hubo un crecimiento considerable del mismo para luego disminuir a los niveles cercanos en la cuarta semana. Por otro lado, la positividad de *L. ivanovii* fue menos variable que la de *L. monocytogenes*, *L. monocytogenes*, partió de seis muestras positivas en la primera semana, disminuyendo hasta la tercera semana y volviéndose a elevar en número para las siguientes semanas, esto sin alcanzar el nivel máximo de la primera semana y coincidiendo con el nivel de *L. ivanovii* para la última semana, donde fue de dos resultados de cultivos positivos para cada especie de *Listeria*.

**FIGURA 1**  
Distribución del total de las muestras de tomates según resultados de los cultivos de *Listeria spp* por semana de recolección



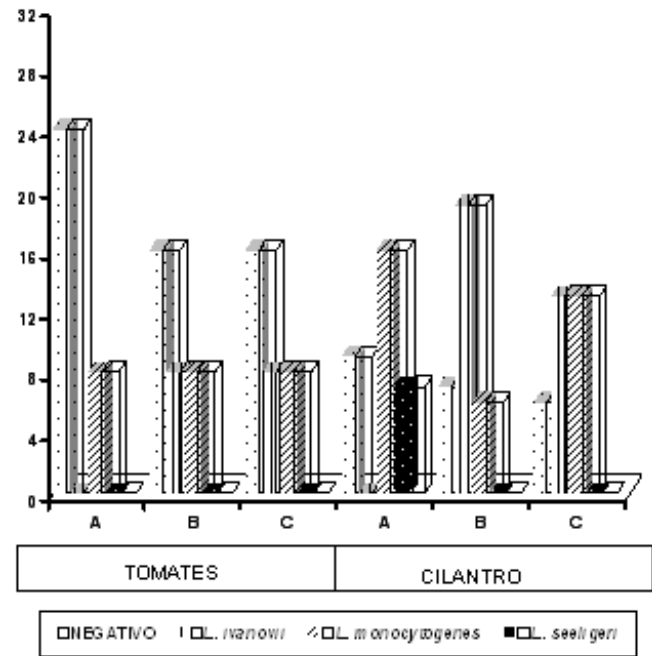
En la Figura 2 se presenta el período de recolección de las muestras de cilantro; *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* tuvieron un crecimiento positivo similar durante las dos primeras semanas, para luego seguir sin grandes alteraciones en las semanas subsiguientes, variando alternativamente la posición predominante de uno u otro. En cuanto a *L. seeligeri* el número de cultivos positivos fue entre cero y uno hasta la séptima semana, para aumentar a cuatro cultivos positivos en la octava semana. La negatividad en los cultivos también tuvo un ascenso en las últimas semanas. Igualmente sucedió que la última semana las tres especies tuvieron casi el mismo número de cultivos positivos, es decir entre tres y cuatro.

**FIGURA 2**  
Distribución del total de las muestras de cilantro según resultados de los cultivos de *Listeria spp* por semana



En la Figura 3 se presenta la distribución de todas las muestras de tomates y cilantro según el crecimiento de *Listeria spp* por supermercado. Se puede observar que la negatividad de *Listeria spp.*, fue siempre superior en las muestras de tomates con respecto a las de cilantro en el mismo supermercado. En tomates, el supermercado A presentó menor número de cultivos positivos para *L. monocytogenes*, mientras que en los supermercados B y C, hubo igual número de casos de *L. monocytogenes*; hubo además una positividad en igual número de *L. ivanovii*.

**FIGURA 3**  
Distribución del total de muestras de tomates y cilantro según resultados de los cultivos de *Listeria spp* por supermercado



Para el caso de las muestras de cilantro, el supermercado A tuvo el mayor número de cultivos positivos de *L. monocytogenes*; en el supermercado B predominaron los cultivos positivos de *L. ivanovii*. La presencia de *L. seeligeri* sólo se evidenció en el supermercado A.

**DISCUSION**

La vía de entrada de *L. monocytogenes* en el organismo, en la mayoría de las formas naturales de listeriosis, es la vía oral. La ingestión de alimentos con cantidades suficientemente altas de *L. monocytogenes* provoca, en un gran número de casos, una infección subclínica, a veces sólo apreciable por una ligera elevación de la temperatura corporal. La infección conduce inevitablemente a una bacteriemia con diseminación

de la bacteria a órganos linfoides y a otros órganos parenquimatosos, con una elevación de la tasa circulante de anticuerpos (19).

Los vegetales tomates y cilantro, no tratados por métodos de esterilización han sido uno de los vehículos de entrada de *L. monocytogenes* al organismo humano (20-22). La identificación de *L. monocytogenes* se realiza por métodos convencionales que requieren mínimo de 5 días para declarar si un alimento está libre de *Listeria* y 10 días adicionales para reconocer la especie *monocytogenes* (23).

En el presente trabajo durante las ocho semanas que duró la recolección de las muestras de tomate y cilantro, en los tres supermercados, se pudo observar que hubo un crecimiento del patógeno en las muestras de cilantro en 36,5%, mientras que en los tomates fue del 25,0%. Pingulkar y col. (5), al evaluar vegetales frescos encontraron 11,2% de *Listeria monocytogenes* en tomates, resultados estos muy por debajo de lo encontrado en este trabajo. Por su parte De curtis y col. (13) reportaron valores más bajos a los encontrados por nosotros, y Miranda (14) no reportó *Listeria monocytogenes* aunque si encontró otras especies de *Listeria spp*. Esta discrepancia de resultados, pudiera deberse a que en muchos establecimientos, mientras los vegetales se encuentran en los anaqueles, son regados con agua para hacerlos más frescos a la vista del consumidor, pudiendo el agua estar contaminada con el patógeno y ser el vehículo mediante el cual llegue al vegetal, como lo indican Sepúlveda y col. (12) y Sánchez y col. (15). Otro punto a considerar es la contaminación poscosecha tal como: traslado, manipulación y almacenamiento de los vegetales, que pudieran aumentar la posibilidad de contaminar con *Listeria spp*. Zhao y col. (20) evidenciaron *Listeria monocytogenes* en las manos de trabajadores de una planta procesadora, lo que permite que fácilmente puedan llegar al vegetal.

En el presente estudio en las muestras de cilantro estudiadas se aislaron *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* y *Listeria seeligeri*, con resultados mucho más elevados que los observado por Miranda (14). Fröder y col. (21), encontraron *Listeria spp* en muestras de vegetales mínimamente procesados, de los cuales 0,6% era *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, los resultados del presente trabajo se relacionan con los datos reportados por Pingulkar y col. (5), donde evidenciaron un alto porcentaje de *Listeria spp* en un grupo de vegetales de ensaladas listas para consumo, encontrando tanto *Listeria ivanovii*, como *Listeria monocytogenes* este último en 50% de los cilantros analizados.

El alto porcentaje de positividad de *Listeria spp* encontrado en este estudio, pudiera deberse como es en el caso del tomate, a la manipulación o al riego y no al supermercado, dado que el control microbiológico desde el origen no asegura la calidad microbiológica del mismo, alterando de esta manera la cadena alimentaria; por otro lado el almacenamiento

prolongado en los anaqueles, pudiera alterar las condiciones de higiene del producto. Carrasco y col. (22) reportaron la habilidad de *Listeria monocytogenes* para sobrevivir y crecer en vegetales almacenados durante periodos largos a temperaturas de refrigeración.

La positividad de *Listeria monocytogenes* encontrada en cilantro mayor que en tomates, se relacionan con los reportados por diferentes investigadores, (14-16, 21,22), esto se explica en virtud de que la planta de tomate es un arbusto y los tomates no están en contacto directo con la tierra abonada, cosa que no es así con el cilantro, que posiblemente se contamina por el riego al salpicar la tierra húmeda sobre la planta. Grif y col. (24), refieren que excrementos de animales infectados con *Listeria monocytogenes* pueden contaminar el suelo, lo que a su vez contamina el vegetal el cual al ser consumido por el hombre pudiera ser causa de listeriosis. Además, los patógenos aprovechan ciertas cicatrices en los vegetales, para poder entrar e iniciar la proliferación en los mismos, aunque el tomate forma una zona de separación natural que es la cicatriz del pedúnculo, de allí que sea más resistente al ataque de microorganismos patógenos que otros productos, como el cilantro.

En este estudio, en las muestras de tomates y cilantro de los tres supermercados estudiados, hubo un crecimiento de *Listeria monocytogenes* muy superior, en relación al incremento observado en los últimos años de brotes de Listeriosis y su asociación con el consumo de vegetales crudos (13), los cuales se han hecho populares en forma lista para servir en los autoservicios de ensaladas de restaurantes y como parte integral en la preparación de diversos tipos de sándwiches, por lo que se ha estimulado la necesidad de un conocimiento general sobre la presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos. Little y col. (25) indican que no es posible la eliminación total de *L. monocytogenes* de todos los alimentos; más bien el punto crítico no es cómo prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, sino cómo controlarla para minimizar sus niveles en los mismos. De allí que las autoridades competentes deban velar que las industrias de alimentos realicen un esfuerzo en elaborar alimentos libres de *L. monocytogenes*, lo cual puede abarcar modificaciones de los equipos y procesos de limpieza ambiental y mejorar los controles de temperatura, para minimizar los posibles riesgos asociados con *L. monocytogenes*; por lo que se recomienda que la aplicación de los Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control establecidos por las normas internacionales de control de calidad de alimentos, se aplique de manera rutinaria en las industrias procesadoras de alimentos.

Se concluye que la presencia de *Listeria monocytogenes*, en las muestras de tomate y cilantro es independiente del sitio de expendio por lo que se evidencia la importancia del control microbiológico que se debe seguir a los vegetales frescos, desde su sitio de origen, para asegurar la calidad de los mis-

mos y evitar el peligro potencial para el consumidor y un posible problema de salud pública cuando existe este tipo de contaminación.

### REFERENCIAS

- Crépet A, Albert I, Dervin C, Carlin F. Estimation of microbial contamination in food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(1):250-258.
- Popowska M, Olszak M, Markiewicz Z. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from dairy products and frozen vegetables to antibiotics inhibiting murein synthesis and to disinfectants. *Pol J Microbiol* 2006; 55(4):279-88.
- Vermeulen A, Smigic N, Gysemans K, Bernaerts K, Geeraerd A, Van Impe J, et al. Microbial safety of mayonnaise based salads: a growth/no growth model for *Listeria monocytogenes* as a predictive tool. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2006; 71(1):321-325.
- Little CL, Taylor FC, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiol* 2007; 24(7-8):711-717.
- Pingulkar K, Kamat A, Bongirwar D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *Int J Food Sci Nutr* 2001; 52(1):15-23.
- Molinos AC, Abriouel H, Ben Omar N, Valdivia E, López RL, Maqueda M, et al. Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(12):7781-7.
- Kim JK, D'Sa EM, Harrison MA, Harrison JA, Address EL. *Listeria monocytogenes* survival in refrigerator dill pickles. *J Food Prot* 2005; 68(11):2356-61
- Niksic M, Niebuhr SE, Dickson JS, Mendonca AF, Koziczkowski JJ, Ellingson JL. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during sauerkraut fermentation. *J Food Prot* 2005; 68(7):1367-74.
- Moos MK. Listeriosis. *AWHONN Lifelines* 2006; 10(6):498-501.
- Posfay-Barbe KM, Wald ER. Listeriosis. *Pediatr Rev* 2004; 25(5):151-9.
- Flessa S, Lusk DM, Harris LJ. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *Int J Food Microbiol* 2005; 101(3):255-262.
- Sepúlveda A, Martínez NE, Ramírez AC, Raygoza M, Trujillo F. *Listeria monocytogenes* como bioindicador sanitario para el control ambiental de las aguas incorporadas a los embalses. *Rev Cub Hig y Epi* 2002; 3:59-62.
- De Curtis M, Franceschi O, De Castro N. *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. *ALAN* 2002; 52 (3).
- Miranda L. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales de alto consumo en la región de Cojedes. Trabajo de ascenso. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales. San Carlos. Venezuela; 1992.
- Sánchez FJ, Mata V, Espinoza A, Villarreal L. Incidencia de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL* 2006; 9:51-56.
- Thévenot D, Delyonnet ML, Christians S, Vernozy-Rozand C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int J Food Microbiol* 2005; 101(2):189-200.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma venezolana para vegetales. Toma de muestras 2001; N° 1769.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos 2001; N° 3718.
- Reguera JJ, Nieto JC, Eiros JM, González Sánchez Z, Oeriz De Lejarazu R, Rodríguez R. Infección alimentaria por *Listeria monocytogenes* Rol *Pediatr* 1995; 36: 215 – 224.
- Zhao T, Podtburg TC, Zhao P, Schmidt BE, Baker DA, Cords B, et al. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(5):3314-20.
- Fröder H, Martins CG, De Souza KL, Landgraf M, Franco BD, Destro MT. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. *J Food Prot* 2007; 70(5):1277-80.
- Carrasco E, Pérez-Rodríguez F, Valero A, García-Gimeno RM, Zurera G. Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis. *J Food Prot* 2007; 70(10):2407-12.
- Allaert C, Escolá M. Métodos de Análisis Microbiológicos de Alimentos. 3era ed. México: Díaz de Santos S.A.; 2002
- Grif K, Patscheider G, Dierich MP, Allerberger F. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(1):16-20.
- Little CL, Taylor FC, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiol* 2007; 24(7-8):711-7.

Recibido: 21-10-2008

Aceptado: 17-07-2009

## Efecto de la adición de harina de soja y concentrado proteico de suero de queso sobre la calidad del pan y la dializabilidad de minerales

*Alexis N. Visentín, Silvina R. Drago, Carlos A. Osella, María A. de la Torre, Hugo D. Sánchez y Rolando J. González*

Instituto de Tecnología de Alimentos - Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.  
Santa Fe, Argentina

**RESUMEN.** En este trabajo se estudió el efecto de la incorporación de harina de soja y de concentrado proteico de suero de queso sobre las propiedades físicas de la masa y sobre la calidad del pan de molde. Se realizaron estudios farinográficos y alveográficos sobre las masas. Los panes fueron evaluados por sus atributos sensoriales a través de un panel entrenado y con relación a sus características nutricionales a través de puntaje químico, lisina disponible y disponibilidad potencial del hierro de fortificación y del zinc y calcio intrínsecos. La incorporación de harina de soja (HS) y de concentrado proteico de suero de queso (WPC) produjeron una importante modificación en las propiedades físicas de la masa. El agregado de WPC a un nivel de 6% de reemplazo, incrementó el puntaje químico del pan de 40.2 a 41.4, mientras que con 6% de harina de soja se elevó a 52.2. La mezcla de ambas fuentes proteicas (HS 6% + WPC 6%) permitió aumentar ese puntaje químico a 60.0 sin deterioro evidente de las características organolépticas de los panes. Además, la pérdida de lisina disponible que ocurrió con el WPC fue atenuada con la incorporación simultánea de harina de soja. El agregado de WPC si bien incrementó el aporte de Ca, disminuyó la disponibilidad de Fe y Zn. Este efecto negativo sobre el Fe fue superado por el agregado de promotores de la absorción de minerales, siendo el agregado del EDTA el más beneficioso. Por otra parte el agregado de harina de soja al 6% mejoró el aporte de proteínas sin perjudicar el de minerales. **Palabras clave:** Harina de soja, proteínas lácteas, panificación, disponibilidad de minerales, dializabilidad.

### INTRODUCCION

El pan es un alimento ampliamente consumido en la Argentina, por lo que la harina de trigo ha sido elegida como vehículo alimentario para el enriquecimiento con hierro (sulfato ferroso) y vitaminas tales como tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico (Ley 25630, Argentina, 2002).

Aunque aporta energía y otros nutrientes, el trigo presenta deficiencia en aminoácidos esenciales como lisina y treonina lo que lo hace pobre desde el punto de vista nutricional. Con respecto al mejoramiento de su calidad proteica, las proteínas de los cereales se pueden complementar con proteínas de legumbres como las de soja o las de concentrados de proteínas de suero lácteo. Este tipo de materias primas aporta minerales

**SUMMARY. Effect of the addition of soy flour and whey protein concentrate on bread quality and mineral dialyzability.** The effects of the addition of soy flour and whey protein concentrate (WPC) on dough properties and mold bread quality were studied. Farinograph and alveograph were used to evaluate dough properties. Mold bread quality was evaluated by assessing sensory attributes using a trained panel and analyzing some nutritional characteristics, such as: protein chemical score, available lysine, and potential availability of fortified iron and also of the intrinsic calcium and zinc. Addition of soy flour and WPC caused significant changes on dough properties. Chemical score of bread was increased from 40.2 to 41.4 when 6% WPC was used, from 40.2 to 52.2 when 6% soy flour was added and up to 60.0 when substitution was made with 6% WPC plus 6% soy flour. This last improvement was obtained without impairing sensory attributes. The highest value of available lysine loss during baking, corresponded to the blend containing WPC, but it was reduced when WPC was used together with soy flour. WPC addition increased calcium content but reduced potential availability of iron and zinc. This negative effect on iron availability was overcome by adding mineral absorption promoters, being EDTA the most effective. On the other hand addition of 6% soy flour improved protein value without affecting mineral availability.

**Key words:** Soy flour, whey protein, baking, mineral availability, dialyzability

intrínsecos además de las proteínas.

En el caso de la soja, tiene un gran potencial de uso como alimento para el ser humano debido a su alto nivel de proteínas de buena calidad y sus propiedades funcionales y nutricionales. El aminoácido limitante es la metionina, mientras que el contenido de lisina excede los requerimientos establecidos, lo que hace factible su uso para suplementación de la harina de trigo (1). Por otro lado, se debe tener en cuenta que la soja posee factores antinutricionales que tienen la propiedad de inhibir la acción de ciertas proteasas del sistema digestivo y son responsables de la disminución del crecimiento de ratas alimentadas con derivados de soja no tratados térmicamente. Estos inhibidores se inactivan por tratamiento térmico adecuado (2,3).

La proteína concentrada de suero es un remanente de la elaboración de queso, donde se separan las proteínas insolubles, que forman el producto principal, de las solubles que forman el suero, con aproximadamente un 90% de agua. Este suero y a través de técnicas como la ultrafiltración se convierte en concentrado proteico de suero, que es aprovechado por diferentes industrias alimenticias. Tanto los concentrados como los aislados de suero de queso (poseen desde 35% a 90% de proteínas) se usan como ingredientes en alimentos por algunas de sus propiedades funcionales (4). Este derivado de la leche posee un buen perfil de aminoácidos y algunos otros nutrientes como por ejemplo el calcio (5).

Con relación a la elaboración de alimentos de interés social, resulta interesante la formulación de un alimento tradicional como es el pan, utilizando tecnologías apropiadas para optimizar la eficacia nutricional, mediante la fortificación con minerales, vitaminas y la utilización de proteínas de buena calidad (6). Sin embargo, el agregado de otras fuentes proteicas, distintas a las del trigo, puede modificar la biodisponibilidad, tanto de los minerales intrínsecos como de los minerales de fortificación (7). La cantidad de mineral absorbido por el cuerpo, en relación al total presente en el alimento, depende de complejas interacciones con el medio fisiológico y con la matriz alimentaria, de la presencia de promotores e inhibidores en la dieta y de factores fisiológicos relacionados al huésped (8).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la incorporación de harina de soja y de concentrado proteico de suero de queso sobre las propiedades físicas de la masa y sobre la calidad sensorial y nutricional del pan de molde, evaluando además su influencia en la disponibilidad potencial del hierro de fortificación y del zinc y calcio intrínsecos.

## MATERIALES Y METODOS

### Materias primas

La harina de trigo (HT) fortificada con sulfato ferroso (30 mg de Fe/kg de harina) fue provista por Molinos Matilde S.A., conteniendo 11.7% de proteínas, 1.2% de lípidos y 0.65% de cenizas, obteniéndose con la misma un 26.5% de gluten húmedo. El concentrado proteico de suero de queso (WPC) fue adquirido a Milkaut (Santa Fe) con 33% de proteínas, con un grado de desnaturalización de 59.3%, con 4.1% de lípidos y 8.3% de cenizas. El grado de desnaturalización de las proteínas del suero se determinó midiendo el contenido de proteínas solubles luego de haberse precipitado las proteínas desnaturalizadas del suero reconstituido con NaCl. La diferencia entre el contenido de proteínas total y el contenido de proteínas no-desnaturalizada constituyen las proteínas desnaturalizadas. La harina de soja (HS) fue obtenida a partir de soja comercial, inactivada térmicamente y molida hasta tamaño de partícula menor de 1.19 mm, la cáscara separada por tamizado y logrando un contenido de proteínas de 35.5%, de lípidos

20.5% y de cenizas 6.3%. Para analizar el contenido de proteínas, grasas y cenizas de las materias primas y de los panes de molde se siguieron técnicas de la AACC (9).

### Inactivación de lipooxigenasa de la soja

La inactivación de lipooxigenasa de la soja se llevó a cabo por medio de la inmersión de los granos en agua en ebullición durante 2 minutos. Posteriormente fueron sumergidos durante 2 minutos en agua a 20°C. Luego se secaron en horno a 50°C durante 1 hora; se dejaron reposar 3 horas a temperatura ambiente para posteriormente tratarlos nuevamente 1 hora a 50°C. Finalmente se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para proceder a la molienda.

### Propiedades físicas de la masa

Los farinogramas fueron realizados en el farinografo Brabender (amasadora para 300g) utilizando la técnica AACC (54-21). Se midió absorción de agua (%), estabilidad al amasado (minutos) y ablandamiento (UB). Los alveogramas fueron realizados en alveógrafo Chopin sobre 250g de harina (AACC 54-30). Se midió energía a la ruptura (W) y relación elasticidad/extensibilidad (P/L).

### Panificación

Se elaboraron los panes utilizando harina de trigo al 100% como testigo (HT) y sustituida por WPC 6% (HT+WPC), por HS 6% (HT+HS) y por la mezcla WPC 6% + HS 6% (HT+WPC+HS). La formulación contenía además: agua (cantidad suficiente para alcanzar 500 UB en ensayo farinografo), levadura 15g, sal 6g, azúcar 18g, oleomargarina 9g y leche en polvo 6g.

Los panes de molde se elaboraron por triplicado, iniciando el proceso con un amasado de 10 minutos en Amasadora Brabender de 300g de capacidad. Luego se llevó la masa a primera fermentación en cámara con temperatura y humedad controladas (27°C y 75/80%), hasta duplicar el volumen de la misma, controlando con medidor de empuje. Posteriormente se dividió la masa en dos trozos de 230g cada uno, si hicieron bollos y se dejó reposar durante 10 minutos. Se laminaron hasta 6 mm de espesor para proceder al armado manual de las piezas. Se colocaron las piezas recién armadas en moldes metálicos lubricados para llevarlos a la segunda fermentación. Las condiciones de temperatura y humedad fueron las mismas que en la primera fermentación, quedando en esas condiciones hasta cuadruplicar el volumen de masa. Finalmente se llevó a cocción en horno eléctrico de laboratorio a 210°C durante 25 minutos sin vapor.

### Volumen específico y evaluación sensorial de los panes

Se determinó el volumen específico de los panes (ml/g), después de 60 minutos de panificados utilizando el método por desplazamiento de semillas (10).

La evaluación sensorial de los panes fue realizada por un panel de tres expertos, quienes asignaron puntaje de acuerdo a su volumen específico y a sus características organolépticas (11). Los atributos evaluados y sus puntajes máximos fueron: Volumen: 15, Corteza: 15, Textura miga: 15, Color miga: 10, Estructura: 10, Aroma y Sabor: 35.

#### Agregado de promotores

Utilizando la formulación 88% de HT + 6% de WPC + 6% HS se evaluó el efecto del agregado de promotores:

1. Acido ascórbico (AA) en un nivel de 300 ppm con respecto a la mezcla de harinas, relación molar (aproximada para las muestras con agregado de hierro) Fe: AA (1: 2).
2. Citrato de sodio (CI) en un nivel de 1.2%, relación molar aproximada, Fe total: CI de (1: 50).
3. EDTA disódico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) en un nivel de 30 mg%, en una relación molar aproximada, Fe total: EDTA (1:1).

#### Medición de la disponibilidad potencial de minerales

Se utilizó la técnica de dializabilidad modificada por Wolfgor y col (12). Las muestras se prepararon al 10% de sólidos en base seca y se llevaron a pH 2 con HCl 4 N. Luego se agregaron 0.8 ml de una solución de pepsina al 16% en HCl 0.1N y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para incrementar gradualmente el pH, se agregó una bolsita de diálisis de 24 cm de longitud de *cutt-off* 6000-8000 Da (Spectrapore) conteniendo una solución buffer. Luego de 50 minutos se agregaron 6.25 ml de una solución de bilis-pancreatina (2.5% de bilis y 0.4% de pancreatina en  $\text{NaHCO}_3$  0.1N) y nuevamente se incubó durante 2 horas a 37°C. Al finalizar la digestión, se retiraron las bolsitas, se enjuagaron con agua destilada y el dializado se trasvasó y pesó. Posteriormente se midió el contenido de Fe, Zn y Ca por espectroscopia de absorción atómica. La disponibilidad potencial de minerales se calculó como la cantidad del mineral dializado expresada como porcentaje del contenido de mineral total en la muestra: % Mineral dializado = (mg Mineral dializado/ mg Mineral en la muestra) x 100.

#### Determinación de minerales totales

Para determinar la concentración de minerales (Fe, Ca y Zn) la muestra se llevó a mufla a 550°C durante 4 horas. Las cenizas fueron levantadas con 10 ml de HCl 10% (v/v). Luego se midió el contenido de minerales por espectroscopia de absorción atómica. Para determinar Ca se utilizó cloruro de lantano a una concentración final de 0,2% a fin de minimizar el efecto de los fosfatos.

#### Evaluación nutricional

El puntaje químico (*chemical score*), que es una medida de eficacia biológica de una proteína, se obtuvo por cálculo teniendo en cuenta los (mg de aminoácidos/ g proteína) / (mg aminoácidos/ g proteína FAO para niños de 2-5 años de edad).

El contenido de lisina disponible se determinó de acuerdo con el método de Carpenter modificado por Booth (13).

#### Tratamiento estadístico de datos

Se realizó el ANOVA seguido por el test LSD (*least significant difference*) para comparar medias al 95% de confianza.

## RESULTADOS

En Tabla 1 se muestran los valores farinográficos y alveográficos de la harina de trigo (HT) y de sus mezclas con WPC y HS. En Tabla 2 se observan los resultados de volumen específico y puntaje del panel a los panes elaborados con la harina testigo y con los distintos reemplazos a la harina de trigo. En la Tabla 3 se muestran el contenido de proteínas, el Puntaje Químico y la lisina disponible en las mezclas de harinas y en panes elaborados con los distintos reemplazos. La concentración de proteínas se incrementó en 17.8 %; 25.9 % y 29.5 % con el agregado de 6 % de WPC, 6 % de HS y con la mezcla de 6 % de WPC + 6 % de HS, respectivamente. Con respecto a las cenizas, el agregado de la harina de soja y de suero de queso aumentó el contenido de minerales en los panes.

TABLA 1  
Valores farinográficos y alveográficos de la harina de trigo (HT) y sus mezclas con concentrado proteico de suero de queso (WPC) y harina de soja (HS)

Tratamiento			Absorción de agua (%)	Estabilidad (minutos)	Ablandamiento (UB)	W	P/L
HT	WPC	HS					
100	0	0	59.6	2.5	40	275	1.3
94	6	0	53.7	3.5	45	93	1.5
94	0	6	60.0	3.0	25	250	2.4
88	6	6	54.6	3.5	40	133	2.2

En la Figura 1 se presentan los valores de dializabilidad (D%) de Fe, Zn y Ca de los panes de las distintas formulaciones y en la Figura 2 el efecto del agregado de promotores en la dializabilidad de minerales.

## DISCUSION

### Farinogramas y Alveogramas

Se puede observar que la absorción de agua se ve modificada en forma destacada cuando se reemplaza la harina de trigo (HT) por WPC en un 6%. Evidentemente las proteínas del WPC no interactúan con el agua del mismo modo que las de HT, de esta forma es necesario incorporar menos cantidad de agua para formar la masa. Esto coincide con lo encontrado por Sánchez y col (14).

Cuando se analiza la influencia del agregado de harina de soja (HS) se puede ver que no hay una diferencia destacable respecto a la absorción de agua ya que las proteínas de soja compiten por el agua con las proteínas de trigo. Este hecho coincide con lo que establecen Ryan y Brewer (15) quienes destacan que las proteínas de soja tienen un efecto negativo debido a su hidrofiliidad, compitiendo por el agua no sólo con las proteínas formadoras del gluten sino también con el almidón. Hecho éste que también se comprueba a través de los menores valores de ablandamiento farinográfico.

Como se observa en la Tabla 1, cuando se reemplaza parcialmente la harina de trigo por WPC el valor de la energía W (área debajo de la curva alveográfica) es significativamente menor que el valor de la energía para HT. Esta disminución se debe principalmente a que el reemplazo produce una dilución del gluten de acuerdo a lo reportado por Maforimbo y col (16), quienes sugieren la competencia entre las proteínas de las legumbres (no formadoras de gluten) y el agua, la ruptura de los complejos proteína-almidón por las proteínas extrañas y la disminución del intercambio de puentes disulfuro, provocando que exista una menor resistencia de la masa al empuje del aire durante el inflamiento. Este efecto negativo que ya fue estudiado por Sánchez y col. (14), es significativamente mayor cuando se utiliza WPC que cuando se reemplaza a parte de la harina de trigo con HS. No obstante, si bien el reemplazo con HS no produce una disminución del valor de energía W genera un efecto no deseado que es el aumento de la tenacidad de la masa expresado a través del elevado valor de la relación P/L.

### Volumen específico y evaluación sensorial

Los resultados mostraron que en el caso de 6% de reemplazo con WPC se obtuvo un bajo valor de volumen específico y de puntaje. No obstante, cabe destacar que los panes presentaron una corteza agradable, subjetivamente de color tostado intenso, como consecuencia de una mayor eficacia de la reacción de Maillard, debido a la importante

cantidad de lactosa presente en el WPC. En cambio con el agregado de 6% de HS se redujo el volumen de pan aunque en forma no significativa. Esta disminución se debe a que la relación P/L indica una masa más tenaz que la del testigo. Además se obtuvo una corteza algo menos coloreada que el control y con algunos puntos oscuros debido a la presencia de partículas de harina de soja. La harina de soja utilizada contiene la lecitina presente en la materia grasa y de acuerdo a Helmerich y Koehler (17) este emulsionante sería el responsable de evitar la disminución del volumen de pan. Cuando el reemplazo de harina de trigo fue del 12% (6% de WPC y 6% HS) se produjo una pérdida de volumen que tampoco fue significativa, siendo además el puntaje muy similar al del testigo. Se aprecia un efecto mejorado cuando se incorporan ambos ingredientes en forma simultánea como si cada uno de ellos anulara el aporte negativo del otro.

TABLA 2

Volúmenes específicos y puntaje de los panes obtenidos con harina de trigo (HT) y de sus mezclas con concentrado proteico de suero de queso (WPC) y harina de soja (HS)

	Tratamiento			Volumen específico (ml/g)	Puntaje panel
	HT	WPC	HS		
100	0	0		4.22 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>
94	6	0		3.76 <sup>c</sup>	68 <sup>c</sup>
94	0	6		4.10 <sup>a,b</sup>	75 <sup>b</sup>
88	6	6		4.02 <sup>b</sup>	83 <sup>a</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

### Calidad proteica de las mezclas de harinas y de los panes

Las proteínas del suero poseen una mayor cantidad de lisina que las de soja (5) lo que produce un mayor valor del puntaje químico de la mezcla. Por esto, el agregado de WPC a un nivel de 6% de reemplazo, incrementó el puntaje químico de la mezcla de 42.2% para HT a 61.2%, mientras que con 6% de HS se elevó a 55.8%. La mezcla de ambas fuentes de proteínas (HS 6% + WPC 6%) permitió llevar el mismo a 71.2%. Sin embargo, durante la cocción hay una pérdida de Lisina Disponible atribuida a la Reacción de Maillard y consecuentemente, una disminución de los valores de puntaje químico. Esta pérdida es de 32% para WPC, de 6% para HS y de 16% para la mezcla WPC+HS. Los mayores valores para WPC se deben a su alto contenido de lactosa.

### Efecto del agregado de distintas fuentes de proteínas en la dializabilidad de minerales

Se puede observar que para el caso del hierro, las muestras HT+WPC y HT+WPC+HS no presentaron diferencias significativas entre ellas, mientras que la DFe% de HT y HT+HS presentaron mayores valores que las anteriores. Esto

puede explicarse teniendo en cuenta diversos factores. Por un lado, es conocido el efecto inhibitorio de las proteínas lácteas en la dializabilidad del hierro, aunque se sabe que el efecto inhibitorio de las proteínas del suero es menor que el de las caseínas (18). Por otra parte, el calcio que aporta el suero de queso, disminuye la disponibilidad de hierro. Esto podría estar relacionado con la formación de complejos insolubles con Fe, que alteran la dializabilidad (19). Por otra parte, Hallberg y col (20), observaron que el agregado de Ca inhibe la acción de fitasas endógenas de la harina, lo que podría implicar un contenido final más alto en fitatos en las muestras con agregado de suero.

TABLA 3

Contenido de proteínas, puntaje químico y lisina disponible en las mezclas de harinas y en panes

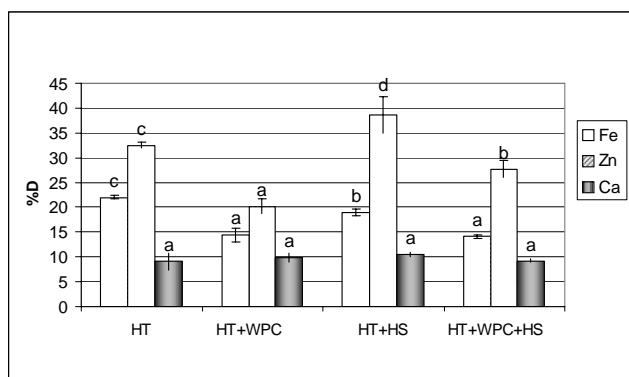
Tratamiento		Proteínas % bs		Puntaje químico (%)		Lisina disponible (g/16 g N)	
HT	WPC	HS	Panes	Harinas	Panes	Harinas	Panes
100	0	0	11.6	42.2	40.2	2.45	2.33
94	6	0	13.6	61.2	41.4	3.54	2.40
94	0	6	14.6	55.8	52.2	3.22	3.03
88	6	6	15.0	71.2	60.0	4.14	3.48

Para el caso del zinc, la muestra con mayor DZn% es la de HT+HS y la de menor dializabilidad son las muestras con agregado de WPC. El Ca forma complejos poli mineral-ligandos conjuntamente con el ácido fítico y el Zn, que disminuyen la disponibilidad del zinc. Esto se debe a que estos complejos fitatos-Zn-Ca son insolubles y consecuentemente no pueden ser absorbidos (21). El efecto beneficioso del agregado de la soja en la DZn% es difícil de explicar ya que se sabe que la harina de soja posee fitatos que son inhibidores de la absorción del zinc y del hierro. En este caso, se ha trabajado con un bajo porcentaje de reemplazo (6%), con lo cual el aporte extra de fitatos no sería importante. Además, la fermentación no sólo hidrolizaría los fitatos presentes en la harina de trigo, sino también los que se podrían incorporar con la soja. Haciendo estas consideraciones, sería posible suponer que el mayor contenido de zinc que aporta la soja a la formulación, aunque bajo podría ser de buena biodisponibilidad.

Con respecto a la DCa%, en todas las muestras fue semejante. Cabe remarcar, que el concentrado de proteínas del suero contiene una buena cantidad de este mineral, por lo tanto las dos muestras que tienen el agregado de WPC, al poseer mayor contenido de calcio aportarán potencialmente mayor cantidad que las otras.

FIGURA 1

Dializabilidad de Fe, Zn y Ca (%D) de panes elaborados con harina de trigo (HT) y de sus mezclas con concentrado proteico de suero de queso (WPC) y harina de soja (HS)



### Efecto del agregado de promotores en la dializabilidad de minerales de los panes.

Tomando como base la mezcla HT+HS+WPC, cuyo pan presentó una buena evaluación sensorial, el mayor nivel proteico y el mayor contenido de lisina disponible y de calcio, se ensayó el agregado de distintos promotores de la absorción de minerales para mejorar su disponibilidad.

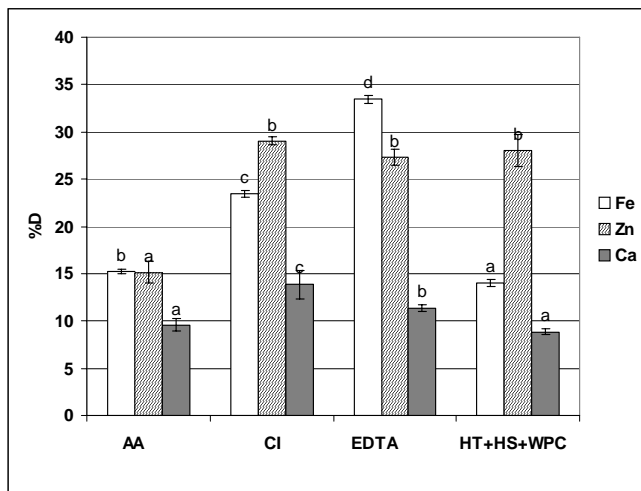
Como se puede observar en la Figura 2 el agregado de ácido ascórbico ejerció un ligero efecto promotor en la DFe%. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en la masa el AA no cumple una función reductora sino oxidante y que ocasiona cambios en la estructura del gluten (22) y que al estar involucrado en otras reacciones químicas puede no estar mejorando de manera importante la dializabilidad del hierro. Sayer y col (23) observaron que el AA es inestable y no efectivo como promotor del Fe en panes, debido a su oxidación durante el proceso de la panificación. El agregado de AA no modificó la %DCa pero disminuyó la %DZn. El agregado adicional de AA, que también tiene efectos indeseables sobre el gluten y que se traducen en una menor calidad panadera, podría generar interacciones del Zn con algunos componentes de la matriz alimentaria que afecten su disponibilidad.

La adición de EDTA aumentó la dializabilidad, del hierro. El Na<sub>2</sub>EDTA es un reconocido promotor de la absorción de hierro en presencia de inhibidores, siendo la relación molar Fe: EDTA 1:1 adecuada para que facilite la absorción del hierro (24). Estudios realizados en adultos y en niños mostraron un significativo aumento en la absorción de hierro cuando se utilizó EDTA como promotor y sulfato ferroso como fortificante en desayunos de prueba y en alimentos a partir de cereales (25). Hurrell y col, (26) también observaron que el mayor incremento en la absorción se obtuvo con el EDTA cuando se evaluaron alimentos utilizando mezclas de harinas de soja con trigo de baja y alta extracción. Por otra parte, el

EDTA promovió muy ligeramente la %DCa y no tuvo efecto en la %DZn.

FIGURA 2

Efecto del agregado de promotores en la dializabilidad de minerales. AA: ácido ascórbico; Cit: citrato; EDTA: EDTA disódico; HT+HS+WPC: pan elaborado con harina de trigo (HT), con concentrado proteico de suero de queso 6% (WPC) y con harina de soja 6% (HS)



El citrato de sodio aumentó la %DFe, comprobándose que en esta matriz alimentaria el citrato puede ejercer un efecto promotor como el observado en otras matrices (27). En el caso del Zn, el citrato no presentó efectos sobre la %DZn. Pabón y Lönnerdall (28) observaron que el citrato puede aumentar la absorción del zinc en leche y fórmulas lácteas fortificadas con hierro. Sin embargo, Mendoza y col (29), no pudieron observar el efecto promotor del citrato en la disponibilidad del Zn en un alimento suplementario diseñado a partir de legumbres y cereales. Esto implica que el efecto promotor del citrato podría depender no sólo de la matriz alimentaria sino también de la presencia de hierro de fortificación. El citrato demostró ser promotor del calcio, pero en una medida moderada. Si bien los valores de DCa% son diferentes estadísticamente, las pequeñas diferencias obtenidas con la técnica de diálisis pueden no ser importantes desde el punto de vista nutricional.

## CONCLUSIONES

La incorporación de harina de soja (HS) y de concentrado proteico de suero de queso (WPC) produjeron modificaciones en las propiedades físicas de la masa. Este hecho no alcanzó para evitar la posibilidad de lograr un proceso aceptable de panificación con la obtención de panes de buena calidad sensorial y muy mejorada característica nutricional.

El agregado de WPC si bien incrementó el aporte de Ca, disminuyó la disponibilidad de Fe y Zn. Este efecto negativo sobre el Fe pudo ser superado por el agregado de promotores de la absorción de minerales, siendo el agregado del EDTA el más beneficioso. Por otra parte el agregado de soja al 6% puede mejorar el aporte de proteínas sin perjudicar el de minerales.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral-Argentina a través de la programación CAI+D (Resol.C.S. N° 170/95) y con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-Argentina.

## REFERENCIAS

1. OMS. Organización Mundial de la Salud. Requerimientos de energía y proteína. 1985.
2. Pringle W. Full fat soy flours. *J Am Oil Chem Soc.* 1974. 51: 75-79.
3. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. Propiedades nutricionales de las proteínas. En: *Proteínas alimentarias*. Ed. Acribia. S.A. 1989. Cap. 5, 107-139.
4. Yang H, Irudayaraj J, Otgonchimeg S, Walsh M. Rheological study of starch and dairy ingredient-based food systems. *Food Chem.* 2004;86: 571-578.
5. Sindayikengera S, Xia W. Nutrition evaluation of caseins and whey protein and their hydrolysates from Protamex. *J Zhejiang Univ Sci.* 2006. 7(2): 90-98.
6. Sánchez HD, Osella CA, de la Torre MA, González RJ, Sbodio OA. Estudio nutricional relativo a proteína, energía y calcio en niños que concurren a comedor escolar. *Arch Latinoamer de Nutr.* 1999. 49(3): 218-222.
7. Davidsson L. Minerals and trace elements in infant nutrition. *Act Paediatr Suppl.* 1994. 395: 38-42
8. Fairweather-Tait SJ. Bioavailability of trace elements. *Food Chem.* 1992. 43: 213-217
9. American Association of Cereal Chemists. *Approved Methods of the AACC*. The Association: St. Paul, MN. 1994.
10. Sanchez HD, Mancuello JC, Fabre HC. Essai de panification pour le pain francais. *Industries de Céréales.* 1983. 25: 29-32.
11. Tosi EA, Re ED, Masciarelli R, Sánchez HD, Osella CA, de la Torre MA. Whole and deffated hyperproteic amaranth flours tested as wheat flour supplementation in mold breads. *Lebensm -Wiss u-Technol.* 2002;35: 472-475.
12. Wolfgor R, Drago SR, Rodríguez V, Pellegrino N, Valencia M. In vitro measurement of available iron in fortified foods. *Food Res Internat.* 2002;35: 85-90.
13. Booth VH. Problems in the Determination of FDNB-Available Lysine. *J Food Sci and Agr.* 1971. 22 (12): 658-666.
14. Sánchez HD, Osella CA, de la Torre MA. Mejoramiento de la calidad nutricional de pan tipo francés. *Arch Latinoamer de Nutr.* 1998. 48(4): 349-353.
15. Ryan KJ, Brewer MS. In situ examination of starch granule-soy protein and wheat protein interactions. *Food Chem.* 2007. 104: 619-629.

16. Maforimbo E, Skurray G, Uthayakumaran S, Wrigley CW. Improved functional properties for soy-wheat doughs due to modification of the size distribution of polymeric proteins. *J Cereal Sci.* 2006. 43: 223-229.
17. Helmerich G, Koehler P. Functional properties of individual classes of phospholipids in bread making. *J Cereal Sci.* 2005. 42: 233-241.
18. Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad PT, Dassenko SA, Cook JD. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 1989. 49: 546-552.
19. Lynch SR. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr Rev.* 1997. 55 (4): 102-110.
20. Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hultén L. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991. 53:112-9.
21. O'Dell BL. Mineral interactions relevant to nutrient requirements. *Symposium J Nutr.* 1989. 119: 1832-1838.
22. Richardson T, Hyslop DB. Enzimas. En: *Química de los Alimentos.* Fennema OR. Ed Acribia SA. Zaragoza, España. 1995. Cap 6: 415-536.
23. Sayers MH, Lynch SR, Charlton RW, Bothwell TH, Walker RB, Mayet F. Iron absorption from rice meals cooked with fortified salt containing ferrous sulfate and ascorbic acid. *Br J Nutr.* 1974. 31: 367-375.
24. MacPhail AP, Pastel RC, Bothwell TH, Lamparelli RD. EDTA and the absorption of iron food. *Am J Clin Nutr.* 1994. 59: 644-648.
25. Davidsson L, Walczk T, Zavaleta N, Hurrell R. Improving iron absorption from a Peruvian school breakfast meal by adding ascorbic acid or Na<sub>2</sub>EDTA. *Am J Clin Nutr.* 2001. 73: 283-287.
26. Hurrell RF, Reddy MB, Burry J, Cook J. An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods. *Br J Nutr.* 2000. 84: 903-910.
27. Ballot D, Baynes RD, Bothwell TH, Gillooly M, Macfarlane BJ, MacPhail AP, Lyons G, Binata N, Madhana NK. In vitro bioavailability of iron from wheat flour fortified with ascorbic acid, EDTA and sodium hexametaphosphate, with or without iron. *Food Chem.* 2003. 80: 545-550
28. Pabón ML, Lönnerdal B. Effect of citrate on zinc bioavailability from milk fractions and infant formulas. *Nutr Res.* 1993. 13: 103-111.
29. Mendoza C, Peerson J, Brown K, Lönnerdal B. Effect of a micronutrient fortificant mixture and two amounts of calcium on iron and zinc absorption from a processed food supplement. *Am J Clin Nutr.* 2004. 79(2): 244 -250.

Recibido: 12-11-2008

Aceptado: 22-06-2009

## Formulación de alimentos para celíacos con base en mezclas de harinas de quínoa, cereales y almidones

Valeria Del Castillo, Gerardo Lescano, Margarita Armada

Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta (CIUNSA), Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Salta, Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI – CONICET) – Argentina

**RESUMEN.** Se formularon alimentos sin gluten para celíacos con base a mezclas de harina de quínoa (*Chenopodium quinoa*), arroz y maíz con almidones. Para la formulación de estos alimentos se usó la herramienta informática (ALIM V1.0) desarrollada por los autores. Se obtuvieron panqueques, scones, prepizza y pan, los cuales fueron evaluados en composición química (proteínas, grasas, cenizas, fibras, humedad y carbohidratos). También se determinaron actividad de agua ( $a_w$ ), aceptabilidad y parámetros de textura (dureza, gomosidad, masticabilidad, adhesividad, cohesividad). Se tomaron como referencia productos comerciales (C) a los que se les realizaron los mismos análisis que a los productos formulados (F). Se encontraron diferencias significativas en los contenidos de proteínas, grasas, humedad, cenizas, fibras y en la mayoría de los parámetros de textura estudiados en ambos grupos de productos ( $p < 0.05$ ). En los panqueques y scones (F) se observan incrementos de proteínas de 88 y 198 % respectivamente, mientras que la prepizza y el pan (F) mostraron contenidos menores (8 y 22 %) respecto de sus pares comerciales; sin embargo todos los productos (F) poseen Cómputos Químicos con valores superiores a 100. Las  $a_w$  de los productos (F) y (C) resultaron similares a los datos citados en bibliografía para productos análogos. Las formulaciones más aceptables fueron los scones y los panqueques con valores superiores al 80%. Los productos formulados en general aportan proteínas de buena calidad, poseen buenas características texturales y adecuados porcentajes de aceptabilidad para ser usados en la alimentación de pacientes celíacos. **Palabras clave:** Alimentos formulados, celíacos, harina de quínoa, mezcla de harinas.

### INTRODUCCION

La enfermedad celíaca ocurre en individuos predispuestos genéticamente, en los cuales la ingestión de alimentos que contienen gluten daña la superficie de la mucosa del intestino delgado lo que lleva a la incapacidad de absorción de nutrientes. El tratamiento de esta patología es exclusivamente dietético y consiste en la eliminación de la dieta de los cereales: trigo, avena, cebada y centeno y de los productos elaborados a partir de sus harinas (1).

La mayoría de los productos de panadería, confitería y pastelería en Argentina contienen harina de trigo como principal componente, entonces, el paciente celíaco encuentra limitaciones en cuanto a su alimentación. Si bien se han desa-

**SUMMARY.** Foods formulation for people with celiac disease based on quinoa (*Chenopodium quinoa*), cereal flours and starches mixtures. Gluten free food for people with celiac disease based on quinoa, rice and corn flours and starches, were formulated. An informatic tool (ALIM V 1.0) developed by the authors, was used for the formulation of these foods. The obtained products were pancakes, scones, precooked pizza and bread which were analyzed in their chemical composition (protein, fat, fiber, moisture, ash and carbohydrates). Water activity ( $a_w$ ), acceptability and texture parameters (hardness, gumminess, chewiness, adhesiveness and cohesiveness) were also determined. Commercial products (C) were taken as reference and were performed the same analysis to formulated products (F). Significant differences were found in protein, fat moisture, ash and fiber content and in most of the texture parameters studied in both food groups ( $p < 0.05$ ). In pancakes and scones (F) was observed an increase of protein of 88 and 198% respectively, while prepizza and bread (F) showed lower contents (8 and 22%) respect to their commercial pairs, however all products (F) have Chemical Scores higher to 100. The  $a_w$  of products (F) and (C), gave values similar to the data cited on bibliography for analogous products. The formulations more acceptable (values over 80%) were scones and pancakes. Overall, the formulated products provide good quality proteins, have good textural characteristics and adequate percentages of acceptability to be used in the feeding of celiac patients.

**Key words:** Formulated foods, celiac, quinoa flour, flour mixes.

rollado una serie de productos comerciales para estos pacientes, su variedad en el mercado local es escasa y no existen productos elaborados con quínoa. Este cereal es un cultivo ancestral de la región de Los Andes. Su grano pequeño contiene proteínas de alto valor biológico, es rico en potasio y otros minerales y a diferencia del trigo posee mayores contenidos de lisina. Puede ser consumido como grano entero o harina. Debido a su valor nutritivo y al no contener gluten es posible su utilización en formulación de productos aptos para celíacos y a su vez revalorizar su cultivo en la región del Noroeste de la Argentina para ser introducido en la alimentación de poblaciones en riesgo nutricional (2,3).

El objetivo del presente trabajo fue formular y obtener alimentos libres de gluten, aptos para pacientes celíacos, en

base a mezclas de harina de quínoa, arroz y maíz con almidones de maíz y mandioca.

## MATERIAL Y METODOS

Para la formulación de alimentos se trabajó con una herramienta informática desarrollada por los autores (ALIM V1.0) (4) cuya base de datos fue elaborada a partir de Tablas de composición química de alimentos (5-7).

Como ingrediente básico se utilizó harina de quínoa (*Chenopodium quínoa*), procedente de Bolivia y adquirida en un comercio local, harina de arroz (*Oryza sativa*), harina de maíz (*Zea mays*), almidón de mandioca o yuca (*Manihot esculenta*) y almidón de maíz, como sustitutos del harina de trigo. Se usó además, leche, huevos, almidón pregelatinizado, lecitina y otros productos aptos para celíacos según Codex Alimentarius (8) y ACELA (Asociación Celíaca Argentina) (9).

Las formulaciones obtenidas (F) fueron: panqueques (crêpes o masa delgada que admite un relleno dulce o salado), scones (bollito dulce para acompañar el te), prepizza (masa para pizza precocida) y pan. A estos productos se les determinó: Energía por cálculo con factor de Atwater, proteína por Kjeldahl, grasas por Soxhlet, humedad y cenizas (técnicas oficiales de AOAC) (10), carbohidratos por diferencia a 100, fibra dietética (ANKOM 220 Fiber Analyzer),  $a_w$  (con higrómetro Rotronic Hygroskop BT a 25 °C), aceptabilidad (en 100 consumidores usando una escala hedónica de 5 puntos) (11) y parámetros de textura (dureza, gomosidad, masticabilidad, adhesividad, cohesividad) con analizador de texturas CNS Farnell QTS 25.

Los productos comerciales (C) usados como referencia fueron alimentos no aptos para celíacos puesto que no se dispone de los mismos en el mercado local. Se tomaron 2 marcas comerciales de cada producto y se realizaron las mismas determinaciones que para los productos formulados.

### Análisis estadístico

Los resultados fueron presentados como media  $\pm$  D.S. de los valores obtenidos por triplicado. Se usó la prueba t para composición química y parámetros de textura de alimentos formulados y comerciales con un nivel de significación del 95% usando el programa Graph Pad Prism 4.0 (12).

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se observan los ingredientes utilizados para cada formulación, en donde la quínoa está incluida en porcentajes entre el 8.22% para el panqueque y el 34.82% para la prepizza. Estas proporciones defieren en función de las características nutricionales y funcionales que son deseables para cada producto.

TABLA 1  
Ingredientes de los alimentos formulados ( g/100g)0

Ingredientes	Panqueque	Scones	Prepizza	Pan
Harina quínoa	8.22	21.51	34.82	26.32
Harina maíz	-	-	13.93	-
Harina arroz	-	32.26	-	-
Almidón maíz	-	-	-	2.63
Almidón mandioca	8.22	-	13.93	26.32
Leche fluida	54.79	-	13.93	-
Leche polvo entera	-	-	-	2.63
Leche polvo descremada	-	8.60	-	-
Huevo entero	27.40	10.75	13.93	-
Clara de huevo	-	-	-	26.32
Azúcar	-	16.13	0.70	4.39
Levadura	-	-	3.48	5.26
Margarina	-	10.75	-	4.39
Aceite	-	-	2.79	-
Sal	1.37	-	2.09	0.88
Lecitina	-	-	0.42	0.88
Agua	-	c.n.	c.n.	-

Los panqueques y scones (F) poseen mayores contenidos de proteína que los (C). Por su parte la prepizza y el pan (F) presentaron menores contenidos de este nutriente. Sin embargo, el Cómputo Químico de los productos (F) presenta valores mayores a 100 para todos los aminoácidos (Tabla 2). La prepizza y scones (F) tienen mayores contenidos de fibras en tanto que la prepizza y los panqueques presentan mayores contenidos de grasa que sus testigos (C). Todos los productos (F) presentaron menores porcentajes de humedad a excepción del pan.

Mediante análisis estadístico se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en todos los macronutrientes entre ambos grupos de alimentos, excepto para la humedad de las prepizzas (Tabla 3). La Tabla 4 presenta los resultados de los parámetros de textura evaluados en productos formulados y comerciales. Los scones, prepizza y pan (F) presentaron mayores valores para todos los parámetros de textura con respecto a los comerciales a excepción de la cohesividad de los scones. Por el contrario, los panqueques (F) presentaron menores valores en todos los parámetros de textura evaluados, respecto de los panqueques (C).

Mediante análisis estadístico se observan diferencias significativas en la mayoría de los parámetros evaluados en scones, prepizza y pan, excepto para la cohesividad del pan y la cohesividad y gomosidad de la prepizza ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

En los panqueques (F) y (C) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en ninguno de los parámetros de textura evaluados.

TABLA 2  
Cómputo químico de ingredientes y productos formulados (F)

	Patrón* (mg/g proteína)	Cómputo Químico						
		Maíz	Arroz	Quínoa	Panqueque	Scones	Prepizza	Pan
Histidina	15	203	157	160	157	169	165	169
Isoleucina	30	119	144	120	168	167	138	163
Leucina	59	208	140	102	135	137	127	131
Lisina	45	63	80	125	161	153	130	148
Azufrados	22	177	200	121	191	159	156	189
Aromáticos	38	236	228	182	234	225	207	227
Treonina	23	164	155	152	194	181	170	171
Triptofano	6	118	194	160	249	200	179	183
Valina	39	130	156	115	148	147	129	151

\* WHO/FAO/UNU. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. WHO Technical Report Series 935. Geneva, 2007 (19).

TABLA 3  
Composición química y aporte calórico de productos formulados (F) y comerciales (C) (g/100g)

		Energía (kcal)	Proteínas	Grasas	H de C <sup>†</sup>	Fibra	Cenizas	Humedad
Panqueque	F	200	9.42±0.05 <sup>a*</sup>	7.75±0.14 <sup>a</sup>	23.24	0.85±0.09 <sup>a</sup>	3.45±0.08 <sup>a</sup>	55.28±0.43 <sup>a</sup>
	C	179	5.00±0.02 <sup>b</sup>	4.33±0.08 <sup>b</sup>	29.90	1.33±0.02 <sup>b</sup>	2.81±0.06 <sup>b</sup>	56.57±0.50 <sup>b</sup>
Scones	F	408	9.93±0.06 <sup>a</sup>	12.47±0.27 <sup>a</sup>	63.92	2.20±0.04 <sup>a</sup>	1.73±0.04 <sup>a</sup>	9.75±0.11 <sup>a</sup>
	C	444	3.33±0.05 <sup>b</sup>	20.61±0.16 <sup>b</sup>	61.40	1.06±0.02 <sup>b</sup>	1.93±0.04 <sup>b</sup>	11.67±0.05 <sup>b</sup>
Prepizza	F	247	7.01±0.04 <sup>a</sup>	6.79±0.17 <sup>a</sup>	39.51	3.80±0.06 <sup>a</sup>	3.17±0.06 <sup>a</sup>	39.71±0.25 <sup>a</sup>
	C	238	7.60±0.03 <sup>b</sup>	3.40±0.07 <sup>b</sup>	44.25	1.80±0.03 <sup>b</sup>	2.65±0.05 <sup>b</sup>	40.30±0.25 <sup>a</sup>
Pan	F	230	6.12±0.05 <sup>a</sup>	5.50±0.12 <sup>a</sup>	39.12	1.81±0.12 <sup>a</sup>	1.77±0.05 <sup>a</sup>	45.66±0.32 <sup>a</sup>
	C	231	7.80±0.04 <sup>b</sup>	3.60±0.05 <sup>b</sup>	41.86	4.40±0.05 <sup>b</sup>	2.14±0.05 <sup>b</sup>	40.20±0.29 <sup>b</sup>

<sup>†</sup> Calculado por diferencia.

\* Letras distintas indican diferencia significativa (p<0.05)

TABLA 4  
Parámetros de Textura de los productos formulados (F) y comerciales (C)

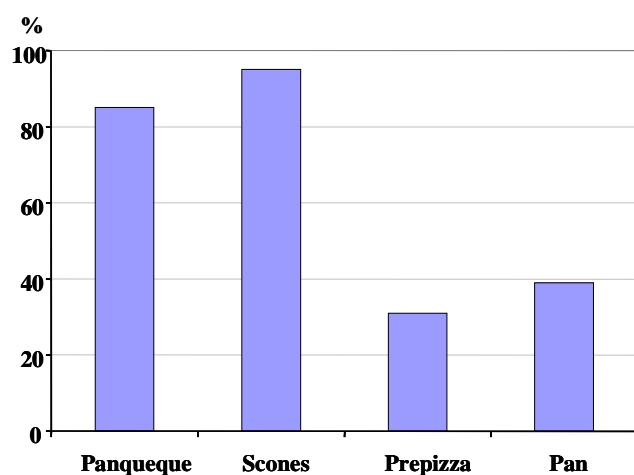
		Dureza (g)	Gomosidad (g)	Masticabilidad (g.mm)	Adhesividad <sup>†</sup> (g.s)	Cohesividad
Panqueque	F	72.67±21.01 <sup>a*</sup>	27.00±7.55 <sup>a</sup>	128.30±50.00 <sup>a</sup>	25.67±8.02 <sup>a</sup>	0.37±0.07 <sup>a</sup>
	C	142.70±45.00 <sup>a</sup>	81.67±44.00 <sup>a</sup>	592.30±152.00 <sup>a</sup>	36.67±7.02 <sup>a</sup>	0.62±0.10 <sup>a</sup>
Scones	F	1681±127 <sup>a</sup>	290.70±6.03 <sup>a</sup>	841.70±95.00 <sup>a</sup>	321.70±49.00 <sup>a</sup>	0.11±0.02 <sup>a</sup>
	C	1061±84 <sup>b</sup>	31.67±3.06 <sup>b</sup>	15.67±4.04 <sup>b</sup>	110.70±5.03 <sup>b</sup>	0.30±0.04 <sup>b</sup>
Prepizza	F	83.67±14.01 <sup>a</sup>	16.67±7.02 <sup>a</sup>	73.33±15.01 <sup>a</sup>	166.70±13.01 <sup>a</sup>	0.20±0.06 <sup>a</sup>
	C	39.67±3.06 <sup>b</sup>	7.07±0.61 <sup>a</sup>	14.10±1.97 <sup>b</sup>	105.70±3.06 <sup>b</sup>	0.17±0.02 <sup>a</sup>
Pan	F	75.33±12.01 <sup>a</sup>	17.67±2.08 <sup>a</sup>	129.30±19.01 <sup>a</sup>	235.70±35.50 <sup>a</sup>	0.24±0.10 <sup>a</sup>
	C	31.67±7.02 <sup>b</sup>	6.67±3.06 <sup>b</sup>	18.67±9.02 <sup>b</sup>	59.67±12.01 <sup>b</sup>	0.22±0.06 <sup>a</sup>

<sup>†</sup> Valores negativos.

\* Letras distintas indican diferencia significativa (p<0.05).

La evaluación sensorial de los productos se presenta en la Figura 1, en la cual los productos más aceptables (categoría “me gusta mucho” + “me gusta”) fueron los scones y panqueques con el 95 y 85 % de aceptabilidad respectivamente.

FIGURA 1  
Aceptabilidad de productos formulados



Todos los productos (F) y (C) presentaron  $a_w$  similares a los datos de bibliografía a excepción de los scones formulados (Tabla 5) (13).

TABLA 5  
Actividad de Agua de productos formulados y comerciales

	Formulado	Comercial	Referencia*
Panqueques	0,999	0,999	> a 0,98
Scones	0,822	0,453	< a 0,60
Prepizza	0,958	0,980	0,93 – 0,98
Pan	0,970	0,980	0,93 – 0,98

\* Valores de bibliografía (13).

## DISCUSION

La sustitución parcial o total de harina de trigo por harinas de otros cereales (por ej. maíz, arroz) en la elaboración de productos de panificación para distintos grupos poblacionales, ha sido estudiada por diversos autores (14-18). Sin embargo, no se han encontrado trabajos de investigación que utilicen harina de quínoa en la formulación de alimentos para celíacos.

Riera (17) formuló panes sin gluten a partir de mezclas de almidones maíz-mandioca 50:50 y 60:40 utilizando leche o agua como medio líquido. Estos panes presentan menores contenidos de humedad (entre 26,79 y 33,96 g/100 g), de pro-

teínas (entre 0,82 y 3,07 g/100 g), de grasas (entre 3,15 y 4,75 g/100 g); mayores contenidos de carbohidratos (entre 80,58 y 93,43 g/100 g) y similares contenidos de cenizas (entre 1,44 y 2,34 g/100 g) al pan obtenido en el presente estudio.

Pedrosa Silva y El-Dash (18) formularon un pan exclusivamente a base de harina de arroz y con sustitución de un 10 % por harina pregelatinizada por extrusión y determinaron parámetros de textura. El pan (F) presenta mayor gomosidad, cohesividad y dureza y similares valores de masticabilidad respecto al pan de arroz.

La aceptabilidad del pan (F) es de aproximadamente 40% (Figura 1). Riera (17) obtuvo para el pan a base de almidones, un nivel de aceptabilidad entre el 84 y 97 %. Las diferencias entre los porcentajes de aceptabilidad pueden ser debidas a los ingredientes utilizados en ambas formulaciones y a la incorporación de mejoradores químicos en el pan.

Los investigadores da Silva Sunada y cols (16) obtuvieron un pan sin gluten a partir de una premezcla de harina de mandioca con una  $a_w$  (0,48) la cual es menor a la determinada en el presente estudio.

Con respecto a los demás productos formulados (panqueques, scones y prepizza) estos poseen proteínas de buena calidad, adecuada aceptabilidad y propiedades texturales que difieren de los patrones comerciales posiblemente debido al uso de harina de quínoa y almidones que carecen de las propiedades texturales que el gluten confiere a las masas elaboradas con trigo. Por esto, los productos (F) se presentan como una alternativa con buenas características nutricionales para ser implementados en la alimentación de pacientes celíacos.

Se concluye que la importancia de este trabajo radica en que: 1) La introducción de quínoa en las formulaciones para celíacos, además de sus ventajas nutricionales, promueve el uso de este grano andino revalorizando su cultivo en el Noroeste Argentino, 2) Facilita el acceso de alimentos libres de gluten para celíacos, actualmente muy escasos en el mercado local y 3) Sienta las bases para el desarrollo de nuevos productos a partir de mezclas que incluyan harina de quínoa, para distintos grupos poblacionales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la colaboración de la Ing. Neli Romano en la realización de los análisis estadísticos y la revisión del Resumen del presente trabajo.

## REFERENCIAS

1. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma XI. Tratamiento y Conservación de Alimentos. Red Iberoamericana de Alimentos para Regímenes Especiales. Guía Do Celíaco. Riare-Portugal; 1995. pp 12-21

2. Tapia M, Morón C. Valor Nutritivo de los Cultivos Andinos Subexplotados. En: Cultivos Andinos Subexplotados y su aporte a la alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Oficina Regional para América Latina y el Caribe; 1990. p.112-134.
3. Ayala, G. Aporte de los Cultivos andinos a la Nutrición Humana. En Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. p 101-112.
4. Lescano, G; Del Castillo,V. y Armada, M. Alim V 1.0 Herramienta Informática para la formulación de nuevos alimentos. Universidad Nacional de Salta; 2004
5. USDA. United State Department of Agriculture. Nutrient Data Laboratory. National Nutrient Database for Standard Reference. Release 19; 2007.
6. Wu Leung. Tabla de composición de alimentos para su uso en América latina. INCAP-ICNND; 1961.
7. Blanco-Metzler,A; Montero-Campos, M y Fernández-Piedra, M. Tabla de composición de alimentos de Costa Rica. Macronutrientes y fibra dietética. San José. Costa Rica;2006.
8. Codex Alimentarius. Codex Stan 118. Adoptado en 1979, enmendado en 1983 y revisado en 2008. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.net/web/Standard\\_list.do?lang=en](http://www.codexalimentarius.net/web/Standard_list.do?lang=en)
9. ACELA. Asociación Celiaca Argentina. Disponible en: <http://www.celiaco.org.ar/ar/alimentos.asp>. Guía de Alimentos y Medicamentos. 2007-2008.
10. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of the AOAC. 12-13 th edition. Washington D.C.;1980.
11. Wittig de Penna, E. Evaluación Sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos. Talleres Gráficos USACH. Chile. 1981. 134 pp.
12. GraphPad Software, Inc. GraphPad Prism V. 4.0. 2003
13. Fennema, O. R. Química de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. España. p 67
14. Reyes Aguilar, M.J.; de Palomo, P. y Bressani, R. Desarrollo de un producto de panificación apto para el adulto mayor a base de harina de trigo y harina de arroz. Arch. Latinoam. Nutr. 2004;54(3)314-321.
15. Blanco-Metzler,A; Montero-Campos, M y Fernández-Piedra, M. Composición Química de productos alimenticios derivados de trigo y maíz elaborados en Costa Rica. Arch. Latinoam. Nutr.2000;50(1)91-96.
16. da Silva Sunada, C; Cereda Pascoli, M; Vilpoux, O y de Avila, E.R. Pré-mistura para produção do pão sem glúten baseada em derivados da mandioca. XI Congresso Brasileiro de Mandioca.
17. Riera, A.L. Productos de Panificación a base de mezclas de almidones. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Salta; 1992. pp.37-41
18. Pedrosa Silva Clerici, M.T. y El-Dash, A. Farinha extrusada de arroz como sustituto de glúten na produção de pão de arroz. Arch. Latinoam. Nutr.2006;56:288-294.
19. WHO/FAO/UNU. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. WHO Technical Report Series 935. Geneva; 2007.

Recibido: 23-03-2009

Aceptado: 24-07-2009

## Composição lipídica do molusco marinho berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) “in natura” e cozido

Mariana Vincenzi Aveiro, Daniel Barrera-Arellano, Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte

Departamento de Nutrição Experimental, Universidade Federal de Santa Catarina– UFSC, Florianópolis – SC, Brasil.  
Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP, Brasil

**RESUMO.** O berbigão *Anomalocardia brasiliana* é um molusco marinho muito consumido na região litorânea de Santa Catarina. No entanto, são escassos os dados na literatura sobre a composição em ácidos graxos e esteróis. O objetivo do presente trabalho foi determinar a composição lipídica do berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) coletados na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI) de Florianópolis/SC, em outono e primavera. O teor de lipídios totais encontrados no berbigão foi de 1.21g% e 0.72g% no outono e primavera, respectivamente. Foram identificados e quantificados 20 ácidos graxos, sendo 6 saturados (14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0), 4 monoinsaturados (16:1, 17:1, 18:1, 20:1) e 10 polinsaturados (18:2, 18:3, 18:4, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6). Observaram-se ácidos graxos polinsaturados em maiores quantidades que os saturados e monoinsaturados em ambas as coletas: 40.7% de polinsaturados, 30.8% de saturados, 17.2% de monoinsaturados no outono e 39.7% de polinsaturados, 27.7% de saturados, 13.7% de monoinsaturados na primavera. O colesterol correspondeu a um valor de 94.38 mg/100g no outono e 76.75mg/100g na primavera. Entre os esteróis, também foi identificado o campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, porém em quantidades inferiores ao colesterol. Estes resultados mostram que o berbigão é fonte não significativa de lipídios totais, apresentando baixos teores de ácidos graxos saturados e colesterol. A recomendação diária do berbigão oferece uma segurança alimentar em relação à ingestão de gorduras totais e colesterol e, portanto este alimento pode fazer parte de uma dieta saudável.

**Palavras-chave:** Lipídios, ácidos graxos, esteróis, molusco marinho, *Anomalocardia brasiliana*.

**SUMMARY.** Lipid composition of marine shellfish berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) raw and cooked. The berbigão *Anomalocardia brasiliana* is a marine shellfish which is commonly consumed in the coastal region of Santa Catarina. However, there are limited available data on the composition of their fatty acids and sterols. The objective of this study was to determine the lipid composition of the berbigão from Reserva Extrativista Marinha de Pirajubaé (REMAPI), Florianópolis/SC, Brasil, during the autumn and spring. The total lipid content was 1.21g% and 0.72g% in the autumn and spring, respectively. Several fatty acids were identified and quantified, including 20 fatty acids, 6 saturated (14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0), 4 monounsaturated (16:1, 17:1, 18:1, 20:1) and 10 polyunsaturated (18:2, 18:3, 18:4, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6). There was a higher proportion of polyunsaturated fatty acids in total than saturated and monounsaturated, regardless of season: 40.7% of polyunsaturated, 30.8% of saturated, 17.2% of monounsaturated in the autumn and 39.7% of polyunsaturated, 27.7% of saturated, 13.7% of monounsaturated in the spring. The cholesterol corresponded to a value of 94.38 mg% in the autumn and 76.75 mg% in the spring. Among the sterols were found campesterol, estigmasterol and  $\beta$ -sitosterol, but in lower quantities than cholesterol. These results showed that the berbigão was not a significant source of lipids, revealing low levels of saturated fatty acids and cholesterol. Berbigão is recommended for daily consumption as part of a healthy diet due to it is safe levels of fats and cholesterol.

**Key words:** Lipids, fatty acid, cholesterol, marine shellfish, *Anomalocardia brasiliana*.

### INTRODUÇÃO

Do ponto de vista dietético, os organismos marinhos, incluindo os moluscos são referidos como fonte alimentar de proteínas com elevado valor biológico, minerais e ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa da série  $\omega 3$ , os quais têm sido relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares, hipertensão, arritmias, desordens autoimunes e câncer (1-5). Apesar deste importante valor nutricional, grande parte da população limita o consumo destes

alimentos, pois desconhece o real valor nutritivo e os considera fonte de colesterol e gorduras prejudiciais à saúde (6,7). Dentre os moluscos marinhos, o berbigão *Anomalocardia brasiliana*, também conhecido como vôngole, chumbinho e maçunim no Brasil, é bastante apreciado e produzido na região litorânea de Santa Catarina, está ligado à cultura de Florianópolis e enraizado nos hábitos alimentares da população (8). No entanto, é escassa a informação sobre sua composição nutricional em especial sua composição lipídica. O objetivo deste trabalho foi determinar a composição lipídica,

perfil de ácidos graxos e esteróis do berbigão “in natura” e cozido coletado na Reserva Extrativista Marinha de Pirajubaé (REMAPI) de Florianópolis/ SC, Brasil, em duas estações do ano (outono e primavera).

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de berbigão da espécie *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) de tamanho comercial de 20mm de comprimento de concha foram coletados, higienizados, acondicionados em caixas de isopor com gelo e transportados imediatamente ao laboratório, onde foram separados em dois lotes. No lote 1, e retirada a concha, desidratados, triturados e homogeneizados em moinho de pás marca FRITSCH, modelo PULVERISETTE 14. O lote 2 foi submetido a cozimento em pequena quantidade de água sem sal, da forma usual da região, até que as valvas dos moluscos tendessem a abrir.

Os lípidios totais foram determinados segundo o método 920.85 da Association of Official Analytical Chemists (9). A composição em ácidos graxos foi determinada de acordo com o método oficial Ce 1-62 da American Oils Chemists's Society (10). Fatty Acid Composition by GLC, utilizando um Cromatógrafo Gasoso Capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM. Coluna capilar: DB-23 AGILENT (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane, dimensões 60 m, Ø int: 0.25 mm, 0.25 µm filme. Condições de operação do cromatógrafo: fluxo coluna = 1.00 mL/min.; Velocidade linear = 24 cm/seg; Temperatura do detector: 280°C; Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura Forno: 110°C – 5 minutos, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 minutos; Gás de arraste: Hélio; Volume injetado: 1.0 µL.

A composição em esteróis foi determinada por Cromatografia líquida (HPLC) segundo o método de Halpen (11) utilizando um Cromatógrafo Perkin Elmer SERIES 200. Detector UV/Visível Perkin Elmer LC 290. Comprimento de onda – 206 nm. Coluna: Supercosil LC-8 Supelco 25cm x 4,6mm. Fase Móvel – Acetonitrila /água 80:20, 1.0 mL/min, 50°C. Na quantificação dos esteróis individuais utilizou-se uma curva padrão, preparada nas mesmas condições.

Os dados de composição lipídica total foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar a existência de diferenças significativas entre as médias, ao nível de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ). Foi utilizado o software Origin 7.5 (2003).

## RESULTADOS

Os valores de lípidios totais nas amostras de berbigão no outono e primavera foram  $1.21 \pm 0.01$  e  $0.72 \pm 0.02$  g% para o berbigão “in natura” e de  $1.63 \pm 0.06$  e de  $1.23 \pm 0.09$  g% para o cozido. Observou-se diferença significativa nos teores de lípidios dos berbigões coletados em outono e primavera, sendo maiores no outono. O cozimento teve um efeito significativo

na concentração dos lípidios, resultante da perda de água no processo.

A composição em ácidos graxos do berbigão *Anomalocardia brasiliana* encontra-se na Tabela 1. Os dados mostram uma maior proporção de ácidos graxos polinsaturados totais que saturados e monoinsaturados, independente da época de coleta (outono ou primavera). Foram identificados 20 ácidos graxos, sendo 6 saturados, 4 monoinsaturados e 10 polinsaturados. O ácido palmítico, eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) foram os ácidos graxos encontrados em maiores proporções. Os teores de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados totais foram superiores no outono.

TABELA 1

Composição em ácidos graxos (mg/100g) do berbigão *Anomalocardia brasiliana* “in natura” e cozido coletado no outono (maio) e primavera (setembro)

Ácidos graxos	“In natura”		Cozido	
	Outono	Primavera	Outono	Primavera
C14:0 Mirístico	14.6	7.6	28.4	17.8
C15:0 Pentadecanóico	5.0	-	8.7	-
C16:0 Palmítico	202.0	92.7	297.5	160.7
C17:0 Margárico	29.1	12.7	42	17.9
C18:0 Esteárico	92.9	53.6	117.9	92.2
C20:0 Araquidóico	3.8	8.3	6.0	16.1
Total saturados	347.4	174.9	500.5	304.7
C16:1 Palmitoléico	56.1	18.2	96.9	35.5
C17:1 Margaroléico	43.3	10.3	6.6	28.2
C18:1 Oléico	67.3	33.3	99.3	65.1
C20:1 Gadoléico	21.6	25.0	55.4	45.9
Total monoinsaturados	188.3	86.8	258.2	174.7
C18:2 Linoléico	7.1	4.5	13.5	8.6
C18:3 Linolênico	7.7	3.7	12.8	7.5
C18:4 Estearidônico	13.7	-	22.4	-
C20:2 Eicosadienóico	13.6	-	20.3	-
C20:3 Eicosatrienóico	4.8	-	10.3	-
C20:4 Araquidônico	52	34.7	61.4	48.8
C20:5 Eicosapentaenóico (EPA)	106.2	45.3	145.2	77.1
C22:4 Docosatetraenóico	7.7	-	10.8	-
C22:5 Docosapentaenóico	51.1	23.1	65.9	38.3
C22:6 Docosahexaenóico (DHA)	179.5	139.2	248.41	220.7
Total polinsaturados	443.4	250.5	611.01	401
Total ômega 3*	344.5	211.3	472.31	343.6
DHA + EPA	285.7	184.5	393.61	297.8
Ni	106.8	117.9	144.7	219.7

- quantidade insignificante

\* somatório dos ácidos graxos 18:3, 20:5, 22:5, 22:6

Ni= Não identificados

Em relação ao efeito da cocção, assim como nos resultados de lipídios totais, o processamento térmico também influenciou no conteúdo dos ácidos graxos, aumentando os valores.

Os teores e composição de esteróis do berbigão são apresentados na Tabela 3. Foram identificados, além do colesterol, típico de tecidos animais, os fitosteróis, Campesterol, stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Pode-se observar que o colesterol foi o esteroide predominante (78% – 84% dos esteróis totais) em todos os casos. O berbigão apresentou no outono as maiores quantidades de esteróis totais que os coletados na primavera, coincidindo também com os maiores valores de lipídios totais. A cocção também influenciou aumentando as concentrações de esteróis totais, porém o  $\beta$ -sitosterol apresentou menor teor após o processamento térmico.

TABELA 3

Composição em esteróis (mg/100g) no berbigão *Anomalocardia brasiliana* “in natura” e cozido coletado no outono (Maio) e primavera (Setembro)

Esteróis	“In natura”		Cozido	
	Outono	Primavera	Outono	Primavera
Colesterol	94.38	76.75	106.93	113.65
Campesterol	10.89	8.42	9.13	13.53
Stigmasterol	10.89	6.55	11.74	4.06
$\beta$ - Sitosterol	4.84	1.87	2.61	4.06
Esteróis Totais	121.00	93.60	130.40	135.30

## DISCUSSÃO

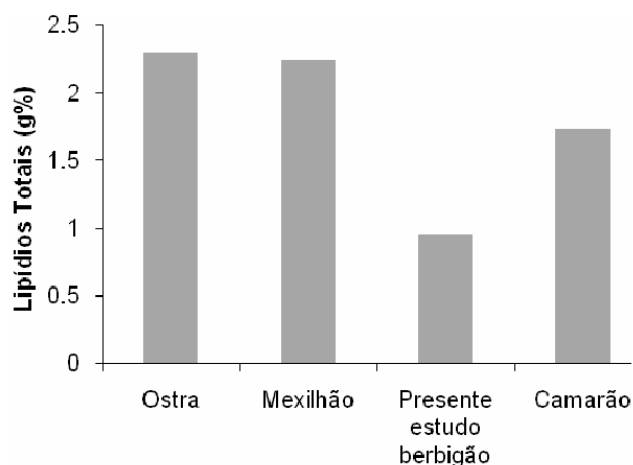
Pedrosa & Cozollino (12) reportam para berbigão coletado na cidade de Natal, RN, teores de lipídios totais de 1.10%, valores aproximados aos encontrados neste trabalho. Orban et al. (13) determinaram a qualidade nutricional e comercial do marisco de areia da mesma família dos berbigões (Veneridae), porém de espécie distinta *Chamelea gallina*, coletado no mar Adriático da Itália, encontraram teores de lipídios totais entre 0.73 e 1.59%. Valores muito semelhantes aos determinados neste estudo, sendo que os menores valores foram obtidos no outono, que corresponde à primavera no hemisfério sul.

Na Figura 1 é mostrada uma comparação entre os teores de lipídios totais do berbigão e outros alimentos marinhos (14), observando que este teor é menor que o de outros moluscos como ostra e mexilhão.

Os teores de lipídios totais do berbigão em estudo também foram inferiores aos valores de ostras *Crassostrea gigas* (1.54% - 2.67%) e mexilhões machos *Perna perna* (1.82% - 1.50%) coletados no verão e primavera, respectivamente na mesma região sul do Brasil e aproximados para camarões coletados no verão (0.98%) (7,15,16).

FIGURA 1

Teor de lipídios totais (g/100g) do berbigão *Anomalocardia brasiliana* “in natura” (média dos valores de outono e primavera) e outros alimentos marinhos (14)



Existe uma variação nos valores de composição dos lipídios para alimentos marinhos, sendo que diversos fatores influenciam nesta diferença nutricional, tais como: espécie, maturidade sexual, local de captura, temperatura da água, estação do ano e especialmente a qualidade e quantidade do fitoplâncton disponível no habitat do organismo (17, 18, 13).

Comparando os resultados do presente estudo com os dados de composição de lipídios do bivalve de areia *Chamelea gallina* da Itália, observa-se uma semelhança no perfil dos ácidos graxos, bem como valores aproximados (13). O bivalve de areia assim como o berbigão apresenta maiores proporções de ácidos graxos polinsaturados sobre os monoinsaturados e saturados em todos os períodos estudados. Os valores encontrados durante um ano para os ácidos graxos polinsaturados (41.6 – 48.1%), ácidos graxos saturados (29.1% – 39.3%) e ácidos graxos monoinsaturados (14.2% – 23.4%) também sofreram variação sazonal. Porém, os maiores teores de ácidos graxos saturados foram encontrados no outono. Já os valores de ácidos graxos polinsaturados e monoinsaturados, foram superiores no inverno. A média em percentual (Tabela 2) dos ácidos graxos entre as duas coletas do presente estudo foram aproximadas aos resultados do bivalve de areia, a qual apresentou média de (33.08%) de ácidos graxos saturados, (17.74%) de ácidos graxos monoinsaturados e (44.24%) de ácidos graxos polinsaturados. O mesmo ocorreu para os valores totais de ômega 3 (38.66%) no bivalve de areia.

TABELA 2

Composição em ácidos graxos dos berbigões *Anomalocardia brasiliana* “in natura” (média dos valores de outono e primavera) e de outros alimentos marinhos: ostra (*Crassostrea gigas*), mexilhão (*Mytilus edulis L.*) e camarão (*Penaeus brasiliensis*)

Ácidos graxos	Berbigão	Ostra 1	Mexilhão 2	Camarão 3
C14:0 Mirístico	1.27	3.19	4.1	1.6
C15:0 Pentadecanóico	0.46	0.78	0.5	1.0
C16:0 Palmítico	16.52	20.20	12.6	18.2
C17:0 Margárico	1.95	1.7	1.6	2.1
C18:0 Esteárico	8.51	3.76	2.7	10.1
C20:0 Araquídico	0.82	2.2	0.2	-
<i>Total saturados</i>	<i>29.53</i>	<i>31.83</i>	<i>21.7</i>	<i>33.0</i>
C16:1 Palmitoléico	4.02	3.93	10.7	6.6
C17:1 Margaroléico	2.80	0.22	0.1	1.0
C18:1 Oléico	5.73	10.27	4.5	12.2
C20:1 Gadoléico	2.97	1.1	3.6	0.5
<i>Total monoinsaturados</i>	<i>15.52</i>	<i>15.52</i>	<i>18.9</i>	<i>20.3</i>
C18:2 Linoléico	0.68	1.98	1.8	2.5
C18:3 Linolênico	0.65	2.35	1.3	0.4
C18:4 Estearidônico	1.26	3.64	3.3	ni
C20:2 Eicosadienóico	1.25	0.15	4.6	0.7
C20:3 Eicosatrienóico	0.44	-	-	ni
C20:4 Araquidônico	5.13	2.97	2.1	6.7
C20:5 Eicosapentaenóico (EPA)	8.46	16.57	20	17.8
C22:4 Docosatetraenóico	0.71	-	-	ni
C22:5 Docosapentaenóico	4.17	0.84	1.0	1.7
C22:6 Docosahexaenóico (DHA)	19.28	14.78	13	10.7
<i>Total polinsaturados</i>	<i>42.03</i>	<i>43.28</i>	<i>47.1</i>	<i>40.5</i>
Total ômega 3*	32.56	34.54	35.8	30.6
DHA + EPA	27.74	31.35	33	28.5
Ni	20.07	13.29	ni	ni

1 Ostra *C. gigas*, média verão e primavera, (7)

2 Mexilhão *M. edulis L.*, (19)

3 Camarão *Penaeus brasiliensis*, (5)

Ni - Não identificados

Variações sazonais foram investigadas nos valores de ácidos graxos do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*. Durante 1 ano, observou-se variação sazonal nos valores dos ácidos graxos polinsaturados (37%-48%), saturados (26%-38%) e monoinsaturados (16-29%). No entanto, foi observada diferença estatística somente para os teores dos ácidos graxos monoinsaturados (17).

Os berbigões do presente estudo apresentam menores proporções de ácidos graxos saturados que a ostra e camarão, e similares proporções de ácidos graxos monoinsaturados que

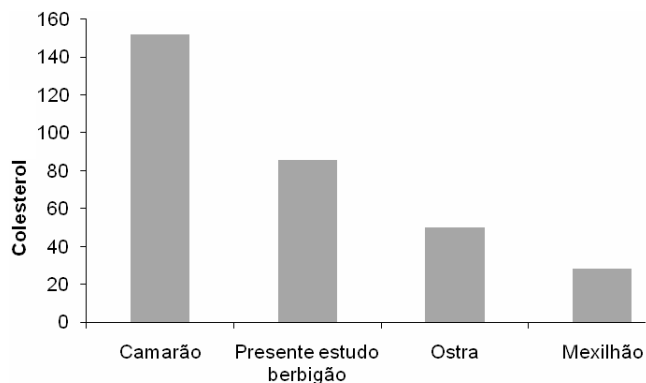
da ostra (Tabela 2). Os ácidos graxos polinsaturados são maiores apenas para o camarão, sendo a ostra e mexilhão superiores. Os berbigões apresentam os maiores valores de DHA e os menores valores de EPA comparado aos outros alimentos marinhos. Em relação ao ômega 3, os valores são superiores somente para o camarão (Tabela 2) (7,19,5).

Ao comparar os resultados do presente estudo com a concentração de colesterol encontrada por Orban et al. (13) para o bivalve de areia *Chamelea gallina* da Itália, observamos que os resultados não foram similares entre essas duas espécies de bivalve de areia. No bivalve de areia *C. gallina* o colesterol também foi prevalente entre os esteróis ao longo do estudo (28.3-34.2mg/100g), porém apresentou menores valores que o berbigão *Anomalocardia brasiliana*. Os esteróis Estigmasterol, Campesterol,  $\beta$ -Sitosterol no bivalve de areia, também foram detectados. A variação nas quantidades de colesterol no berbigão do presente estudo e o estudo de Orban et al. (13) podem ser atribuídas as variações sazonais, tipo de alimentação, local de origem e também, às diferentes metodologias utilizadas na quantificação (5,13).

Comparando a concentração de colesterol dos berbigões *A. brasiliana* “in natura” do presente estudo (média do outono e primavera) com os resultados de tabela nutricional de outros alimentos marinhos “in natura” (Figura 2) observa-se que os berbigões apresentam menores quantidades de colesterol que o camarão *Penaeus brasiliensis*, mas maiores teores que a ostra *Crassostrea gigas* e mexilhão *Mytilus edulis L.* (14).

FIGURA 2

Teor de colesterol (mg/100g) do berbigão *Anomalocardia brasiliana* “in natura” (média dos valores de outono e primavera) e outros alimentos marinhos (14)



O berbigão em estudo apresentou maior valor de colesterol que ostras *Crassostrea gigas* (3.5-12.3mg/100g) coletadas no verão e primavera, respectivamente na mesma região sul do Brasil e menores que camarões coletados no verão (102.11mg/100g) (7,16).

A ênfase atual em nutrição para indivíduos saudáveis é no sentido de uma ingestão reduzida em gorduras totais e ácidos graxos saturados, assim como uma ingestão diária de no máximo 300mg de colesterol (20). Após análise da fração lipídica do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* pode-se concluir que esse alimento é fonte não significativa de gorduras totais, apresentando baixos teores de ácidos graxos saturados e colesterol e alta concentração de ácidos graxos polinsaturados, principalmente da série ômega 3.

### REFERÊNCIAS

- Rao VA, Janezic SA. The role of dietary phytosterols in colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 1992;18(1):43-52.
- Pelletier X, Belbraouet S, Mirabel D, Mordret F, Perrin JL, Pages X, Debry G. A diet moderately enriched in phytosterol lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann Nutr Metab*. 1995;39(5):291-295.
- Candela M, Astiasaran I, Bello J. Effects of frying and warmholding on fatty acids and cholesterol of sole (*Solea solea*), codfish (*Gadus morrhua*) and hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chem*. 1997;58(3):227-1.
- Molyneaux M, Lee CM. The U.S Market for marine nutraceutical products. *Food Technol*. 1998;52(6):56-57.
- Moura AFP, Torres RP, Mancini J, Tenuta A. Caracterização da fração lipídica de amostras comerciais de camarão-rosa. *Arch Latinoam Nutr*. 2002;52(2):1-10.
- Arana LV. Cultivo de plantas aquáticas e moluscos. In: Arana LV. Fundamentos de aquíicultura. Florianópolis: UFSC; 2004. p. 85-121.
- Parisenti J. Determinação dos esteróis e ácidos graxos em ostras (*Crassostrea gigas*) da região de Florianópolis – SC e efeito do seu consumo no colesterol sérico de ratas (*Rattus norvegicus*) [dissertation]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.
- Pezzuto PR, Echternacht AM. Avaliação de impactos da construção da Via Expressa SC-Sul sobre o berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé, (Florianópolis, SC-Brasil). *Atlântica*. 1999;21: 105-119.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th. Gaithersburg MD. 2005
- A.O.C.S 2004. Official and tentative methods of the American Oils Chemists' Society. In: Link WE (ed) American Oil Chemists' Society. Champaign, IL.
- Holen B. Rapid separation of free sterols by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *J Amer Oil Chem Soc*. 1985;62:1344-1346.
- Pedrosa LFC, Cozzolino SMF. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(2):154-157.
- Orban E, Lena G, Nevigato T, Casini I, Caproni R, Santaroni G, Giulini G. Nutricional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chem*. 2006;101:1063-1070.
- United States Department of Agriculture (USDA). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20. Beltsville, Maryland: Beltsville Agricultural Research Center; 2007. Se consegue en: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/index.html>
- Tramonte VLCC, Parisenti J, Faccin GL. Composição nutricional de ostras, in natura e cozidas, coletadas em diferentes estações do ano, na cidade de Florianópolis, SC. *Hig Aliment*. 2005;19(134):31-34.
- Freygang J. Determinação do colesterol e ácidos graxos em camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na região de Santa Catarina e efeito do seu consumo no perfil lipídico de ratos (*Rattus norvegicus*) [dissertation]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.
- Orban E, Lena G, Nevigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chem*. 2002;77:57-65.
- Oliveira SK. Efeito da sazonalidade sobre o valor químico de peixes marinhos do litoral catarinense: sardinha (*Sardinella brasilienses*), atum (*Katsuwonus pelamis*), corvina (*Micropogonias furnieri*) e pescada (*Cynoscion steindacheri*) [dissertation]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.
- Coperman LA, Parrisch CC. Lipids Classes, Fatty Acids and Sterols in Seafood from Gilbert Bay, Southern Labrador. *J Agricultural Food Chem*. 2004;52:4872-4881.
- Brasil. Resolução RDC nº 360 do Ministério da Saúde de 23 de dezembro de 2003. Diário Oficial da República do Brasil, 2003. Se consegue en: <http://www.anvisa.gov.br>

Recibido: 23-04-2009

Aceptado: 24-07-2009

# 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 revisión, editoriales, conferencias y simposia y trabajos científicos originales sobre temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, ciencia y tecnología de alimentos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, nutrición clínica y comunitaria, educación en nutrición y microbiología de alimentos.

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados para ser publicados y se reserva el derecho de no publicar los originales que no se ajusten a los lineamientos de la revista. No se devolverán originales ni se mantendrá correspondencia sobre aquellos que no sean publicados. ALAN se reserva los derechos de reproducción de los artículos seleccionados.

ALAN se acoge a las normas de los requisitos uniformes del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (CIDRM), también conocido como el Grupo de Vancouver. A continuación se entrega un resumen de los aspectos más relevantes para la preparación de manuscritos que se presentan a las revistas biomédicas y se añaden algunas recomendaciones específicas para ALAN.

## Requisitos para la presentación de manuscritos

### Resumen de los requisitos técnicos

- Todas las partes del manuscrito estarán a doble espacio.
- Revise la secuencia: página del título, resumen y palabras clave, texto agradecimientos, referencias, cuadros (cada uno en página aparte), pies e epígrafes de las ilustraciones.
- Las ilustraciones se presentarán en forma de impresiones fotográficas sin tomar, y no deberán exceder de 203 x 254 mm.
- Incluya la autorización para reproducir material publicado con anterioridad o para usar ilustraciones en las que se pueda identificar a los sujetos humanos.
- Adjunte la transferencia de los derechos de autor y otros formularios.
- Presente el número exigido de copias impresas del artículo (ALAN exige original, 3 copias y el diskete correspondiente, en el caso de envío por correo postal).
- Para el envío por correo electrónico consulte las direcciones que aparecen en la primera contraportada de la revista.
- Guarde copias de todo lo que envíe.

### Principios generales

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide generalmente, aunque no por fuerza, en secciones que llevan estos

encabezamientos: introducción, métodos, resultados y discusión. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Es probable que otro tipo de artículos -como los informes de casos, las revisiones y los editoriales- exijan otra estructura. Para mayor orientación, los autores deberán consultar la revista en la que pretenden publicar.

Mecanografíese el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 280 mm. Usar doble espacio en todas las palabras del manuscrito -es decir, la portada, el resumen, el texto, los agradecimientos, las referencias, cada cuadro y los pies o epígrafes de las figuras-, así como márgenes amplios, permite que los editores, revisores y correctores corrijan el texto línea por línea y anoten observaciones y preguntas directamente en el original impreso. Si los manuscritos se presentan en formato electrónico, los archivos deben venir a doble espacio. Siempre numere las páginas.

### Portada

La portada debe llevar la siguiente información:

1) El título del artículo. Los títulos concisos son más fáciles de leer que los largos y enrevesados. Sin embargo, los títulos demasiado cortos pueden omitir información importante, como el diseño del estudio (que es particularmente importante para identificar los ensayos controlados aleatorizados). Los autores deben incluir en el título toda la información que permita que la recuperación electrónica del artículo sea al mismo tiempo sensible y específica; 2) Los nombres y la afiliación institucional de los autores. Algunas revistas publican el grado académico más alto de cada autor, mientras que otras no lo hacen; 3) El nombre de los departamentos e instituciones a los que debe atribuirse el trabajo; 4) Las cláusulas de descargo de responsabilidad, si las hubiera; 5) Los autores corresponsales. Hay que anotar el nombre, dirección postal, número de teléfono y de fax y dirección de correo electrónico del autor encargado de la correspondencia acerca del manuscrito (el "autor corresponsal"); 6) Nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) Procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todos ellos.

### Autoría

Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica

el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores. Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

### Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. ALAN exige que todo trabajo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen debe presentarse en español, con el título también en español e igualmente con sus palabras clave. Deberá leerse corrido no en secciones.

### Introducción

Proporcione el contexto o los antecedentes del estudio, es decir, la naturaleza del problema y su importancia. Enuncie la finalidad o el objetivo de investigación específico del estudio u observaciones, o bien la hipótesis que se ha puesto a prueba; el objetivo de investigación suele expresarse con más nitidez si se formula como una pregunta. Hay que expresar con claridad los objetivos principales y secundarios y describir todo análisis de subgrupos que haya sido especificado con anterioridad. Mencione las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

### Materiales y Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos

los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio. Para mayor información sobre estos aspectos, consulte la Sección J del Título III del documento que se indica al final.

**Estadística.** Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición (por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas estadísticas de comprobación de hipótesis, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información sobre la magnitud del efecto. Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado.

### Resultados

Presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de las Tablas ni de las ilustraciones; destaque o resuma tan solo las observaciones importantes.

Cualquier material adicional o complementario y los detalles técnicos pueden reunirse en un apéndice, de manera que estén accesibles pero sin interrumpir el flujo del texto; otra posibilidad es que dicho apéndice solo se publique en la versión electrónica de la revista.

Al resumir los datos en la sección de resultados, facilite los resultados numéricos no solo como derivados (por ej., porcentajes), sino también como los números absolutos a partir de los cuales se calcularon los derivados, y especifique los métodos estadísticos mediante los cuales se analizaron. Limite las Tablas y las Figuras al número necesario para explicar el argumento del artículo y evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las Gráficas y las Tablas. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra».

### Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

En el caso de estudios experimentales, es útil empezar la discusión resumiendo brevemente los resultados principales; luego, analizar los posibles mecanismos o explicaciones de estos resultados; comparar y contrastar los resultados con otros estudios pertinentes; señalar las limitaciones del estudio; y, por último, explorar las implicaciones de los resultados para la investigación futura y para la práctica clínica.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afirmaciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos adecuados. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales.

### Agradecimientos

Todos los colaboradores que no satisfagan los criterios de la autoría deben mencionarse en la sección de agradecimientos. Por ejemplo, se puede agradecer la ayuda de una persona que prestó ayuda estrictamente técnica, de alguien que ayudó con la redacción o del director de departamento que solo brindó apoyo general. También debe reconocerse el apoyo económico y material.

### Tablas

Mecanografía o imprima cada tabla a doble espacio y en hoja aparte. No presente las tablas en forma de impresiones fotográficas. Numérelas consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada una. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: \*, †, ‡, \*\*, ††, ‡‡.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media. No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros. Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que las tablas suplementarias que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensas para publicarlas, queden depositadas en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionadas por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos tablas se presentarán junto con el artículo para su consideración por parte de los árbitros.

### Ilustraciones (figuras)

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en

blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones. Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quién sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

### Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, peso y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiplos y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

### Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

### Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Consulte el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web <http://www.nlm.nih.gov/>

Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto.

Todas las referencias deberán presentarse de modo correcto y completo. La veracidad de la información contenida en ésta sección es responsabilidad del autor (de los autores).

## EJEMPLOS

### Artículos de revistas

#### 1. Artículo estándar

##### Hasta seis autores:

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347:284-7.

##### Más de seis autores:

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.

#### 2. Institución como autor

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension.* 2002;40(5):679-86.

#### 3. No se indica el nombre del autor

21st century heart solution may have a sting in the tail. *BMJ.* 2002;325(7357):184.

#### 4. Suplemento de un volumen

Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache.* 2002;42 Suppl 2:S93-9.

#### 5. Suplemento de un número

Glaser TA. Integrating clinical trial data into clinical practice. *Neurology.* 2002;58(12 Suppl 7):S6-12.

#### 6. Parte de un volumen

Abend SM, Kulish N. The psychoanalytic method from an epistemological viewpoint. *Int J Psychoanal.* 2002;83(Pt 2):491-5.

#### 7. Parte de un número

Ahrar K, Madoff DC, Gupta S, Wallace MJ, Price RE, Wright KC. Development of a large animal model for lung tumors. *J Vasc Interv Radiol.* 2002;13(9 Pt 1):923-8.

8. Artículo publicado en formato electrónico antes que en versión impresa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3828-31. Epub 2002 Jul 5.

### Libros y otras monografías

#### 9. Autores individuales

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

#### 10. Directores (“editores”), compiladores como autores

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics.* 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002..

#### 11. Autor (es) y editor (es)

Breedlove GK, Schorfheide AM. Adolescent pregnancy. 2nd ed. Wiczorek RR, editor. White Plains (NY): March of Dimes Education Services; 2001.

#### 12. Institución (es) como autor

Royal Adelaide Hospital; University of Adelaide, Department of Clinical Nursing. *Compendium of nursing research and practice development, 1999-2000.* Adelaide (Australia): Adelaide University; 2001.

#### 13. Capítulo de libro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

#### 14. Tesis

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

#### 15. Patente

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible endoscopic grasping and cutting device and positioning tool assembly. United States patent US 20020103498. 2002 Aug 1.

### Otros tipos de publicaciones

#### 16. Artículo de periódico

Tynan T. Medical improvements lower homicide rate: study sees drop in assault rate. *The Washington Post.* 2002 Aug 12;Sect. A:2 (col. 4).

#### 17. Documentos legales

Ley pública:  
Veterans Hearing Loss Compensation Act of 2002, Pub. L. No. 107-9, 115 Stat. 11 (May 24, 2001).

**Material en soporte electrónico***18. CD-ROM*

Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

*19. Artículo de revista en Internet*

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

**Costo por página**

Debido a los altos costos de impresión y publicación, ALAN ha estipulado dentro de su política editorial, el cobro de U.S. \$ 15 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.

Por motivo de no existir al presente una traducción oficial al español, se transcribe por razones de espacio, sólo los títulos que comprenden la versión actualizada a Octubre de 2008, del documento que sigue. Para una lectura completa de esta versión, los autores deben acudir al siguiente sitio <http://www.icmje.org>

**UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS: WRITING AND EDITING FOR BIOMEDICAL PUBLICATION. Updated October 2008.**

- I. Statement of Purpose
  - A. About the Uniform Requirements
  - B. Potential Users of the Uniform Requirements
  - C. How to Use the Uniform Requirements
- II. Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research
  - A. Authorship and Contributorship
    1. Byline Author
    2. Contributors Listed in Acknowledgements
  - B. Editorship
    1. The Role of the Editor
    2. Editorial Freedom
  - C. Peer Review
  - D. Conflict of Interest
    1. Potential Conflicts of Interest Related to Individual Author's Commitments
    2. Potential Conflicts of Interest Related to Project Support
    3. Potential Conflicts of Interest Related to Commitments of Editors, Journal Staff, or Reviewers
  - E. Privacy and Confidentiality
    1. Patients and Study Participants
    2. Authors and Reviewers
  - F. Protection of Human Subjects and Animals in Research

**III. Publishing and Editorial Issues Related to Publication in Biomedical Journals**

- A. Obligation to Publish Negative Studies
- B. Corrections, Retractions and "Expressions of Concern".
- C. Copyright
- D. Overlapping Publications
  1. Duplicate Submission
  2. Redundant Publication
  3. Acceptable Secondary Publication
  4. Competing Manuscripts based on the Same Study
    - a. Differences in Analysis or Interpretation
    - b. Differences in Reported Methods or Results
  5. Competing Manuscripts Based on the Same Database
- E. Correspondence
- F. Supplements, Theme Issues and Special Series
- G. Electronic Publishing
- H. Advertising
- I. Medical Journals and the General Media
- J. Obligation to Register Clinical Trials

**IV. Manuscript Preparation and Submission**

- A. Preparing a Manuscript for Submission to Biomedical Journals
  1. a. General Principles
  - b. Reporting Guidelines for Specific Study Designs
  2. Title Page
  3. Conflict of Interest Notification Page
  4. Abstract and Key Words
  5. Introduction
  6. Methods: a) Selection and Description of Participants.
    - b) Technical Information.
    - c) Statistics
  7. Results
  8. Discussion
  9. References.
    - a) General Considerations Related to References.
    - b) Reference Style and Format
  10. Tables
  11. Illustration (Figures)
  12. Legends for Illustrations (Figures)
  13. Units of Measurements
  14. Abbreviations and Symbols
- B. Sending the Manuscript to the Journal

**V. References**

- A. Print References Cited in this Document
- B. Other Sources of Information Related to Biomedical Journals

**VI. About the International Committee of Medical Journal Editors**

**VII. Authors of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biochemical Journals**

**VIII. Use, Distribution and Translation of the Uniform Requirements**

**IX. Inquires**

el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores. Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

### Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. ALAN exige que todo trabajo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen debe presentarse en español, con el título también en español e igualmente con sus palabras clave. Deberá leerse corrido no en secciones.

### Introducción

Proporcione el contexto o los antecedentes del estudio, es decir, la naturaleza del problema y su importancia. Enuncie la finalidad o el objetivo de investigación específico del estudio u observaciones, o bien la hipótesis que se ha puesto a prueba; el objetivo de investigación suele expresarse con más nitidez si se formula como una pregunta. Hay que expresar con claridad los objetivos principales y secundarios y describir todo análisis de subgrupos que haya sido especificado con anterioridad. Mencione las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

### Materiales y Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos

los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio. Para mayor información sobre estos aspectos, consulte la Sección J del Título III del documento que se indica al final.

**Estadística.** Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición (por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas estadísticas de comprobación de hipótesis, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información sobre la magnitud del efecto. Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado.

### Resultados

Presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de las Tablas ni de las ilustraciones; destaque o resuma tan solo las observaciones importantes.

Cualquier material adicional o complementario y los detalles técnicos pueden reunirse en un apéndice, de manera que estén accesibles pero sin interrumpir el flujo del texto; otra posibilidad es que dicho apéndice solo se publique en la versión electrónica de la revista.

Al resumir los datos en la sección de resultados, facilite los resultados numéricos no solo como derivados (por ej., porcentajes), sino también como los números absolutos a partir de los cuales se calcularon los derivados, y especifique los métodos estadísticos mediante los cuales se analizaron. Limite las Tablas y las Figuras al número necesario para explicar el argumento del artículo y evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las Gráficas y las Tablas. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra».

### Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

En el caso de estudios experimentales, es útil empezar la discusión resumiendo brevemente los resultados principales; luego, analizar los posibles mecanismos o explicaciones de estos resultados; comparar y contrastar los resultados con otros estudios pertinentes; señalar las limitaciones del estudio; y, por último, explorar las implicaciones de los resultados para la investigación futura y para la práctica clínica.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afirmaciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos adecuados. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales.

### Agradecimientos

Todos los colaboradores que no satisfagan los criterios de la autoría deben mencionarse en la sección de agradecimientos. Por ejemplo, se puede agradecer la ayuda de una persona que prestó ayuda estrictamente técnica, de alguien que ayudó con la redacción o del director de departamento que solo brindó apoyo general. También debe reconocerse el apoyo económico y material.

### Tablas

Mecanografía o imprima cada tabla a doble espacio y en hoja aparte. No presente las tablas en forma de impresiones fotográficas. Numérelas consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada una. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: \*, †, ‡, \*\*, ††, ‡‡.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media. No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros. Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que las tablas suplementarias que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensas para publicarlas, queden depositadas en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionadas por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos tablas se presentarán junto con el artículo para su consideración por parte de los árbitros.

### Ilustraciones (figuras)

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en

blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones. Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quién sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

### Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, peso y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiplos y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

### Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

### Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Consulte el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web <http://www.nlm.nih.gov/>

Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto.

Todas las referencias deberán presentarse de modo correcto y completo. La veracidad de la información contenida en ésta sección es responsabilidad del autor (de los autores).

## EJEMPLOS

### Artículos de revistas

#### 1. Artículo estándar

##### *Hasta seis autores:*

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347:284-7.

##### *Más de seis autores:*

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.

#### 2. Institución como autor

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension.* 2002;40(5):679-86.

#### 3. No se indica el nombre del autor

21st century heart solution may have a sting in the tail. *BMJ.* 2002;325(7357):184.

#### 4. Suplemento de un volumen

Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache.* 2002;42 Suppl 2:S93-9.

#### 5. Suplemento de un número

Glauser TA. Integrating clinical trial data into clinical practice. *Neurology.* 2002;58(12 Suppl 7):S6-12.

#### 6. Parte de un volumen

Abend SM, Kulish N. The psychoanalytic method from an epistemological viewpoint. *Int J Psychoanal.* 2002;83(Pt 2):491-5.

#### 7. Parte de un número

Ahrar K, Madoff DC, Gupta S, Wallace MJ, Price RE, Wright KC. Development of a large animal model for lung tumors. *J Vasc Interv Radiol.* 2002;13(9 Pt 1):923-8.

8. Artículo publicado en formato electrónico antes que en versión impresa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3828-31. Epub 2002 Jul 5.

### Libros y otras monografías

#### 9. Autores individuales

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

#### 10. Directores (“editores”), compiladores como autores

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics.* 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002..

#### 11. Autor (es) y editor (es)

Breedlove GK, Schorfheide AM. Adolescent pregnancy. 2nd ed. Wiczorek RR, editor. White Plains (NY): March of Dimes Education Services; 2001.

#### 12. Institución (es) como autor

Royal Adelaide Hospital; University of Adelaide, Department of Clinical Nursing. *Compendium of nursing research and practice development, 1999-2000.* Adelaide (Australia): Adelaide University; 2001.

#### 13. Capítulo de libro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

#### 14. Tesis

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

#### 15. Patente

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible endoscopic grasping and cutting device and positioning tool assembly. United States patent US 20020103498. 2002 Aug 1.

### Otros tipos de publicaciones

#### 16. Artículo de periódico

Tynan T. Medical improvements lower homicide rate: study sees drop in assault rate. *The Washington Post.* 2002 Aug 12;Sect. A:2 (col. 4).

#### 17. Documentos legales

Ley pública:  
Veterans Hearing Loss Compensation Act of 2002, Pub. L. No. 107-9, 115 Stat. 11 (May 24, 2001).

**Material en soporte electrónico***18. CD-ROM*

Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

*19. Artículo de revista en Internet*

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

**Costo por página**

Debido a los altos costos de impresión y publicación, ALAN ha estipulado dentro de su política editorial, el cobro de U.S. \$ 15 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.

Por motivo de no existir al presente una traducción oficial al español, se transcribe por razones de espacio, sólo los títulos que comprenden la versión actualizada a Octubre de 2008, del documento que sigue. Para una lectura completa de esta versión, los autores deben acudir al siguiente sitio <http://www.icmje.org>

**UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS: WRITING AND EDITING FOR BIOMEDICAL PUBLICATION. Updated October 2008.**

- I. Statement of Purpose
  - A. About the Uniform Requirements
  - B. Potential Users of the Uniform Requirements
  - C. How to Use the Uniform Requirements
- II. Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research
  - A. Authorship and Contributorship
    1. Byline Author
    2. Contributors Listed in Acknowledgements
  - B. Editorship
    1. The Role of the Editor
    2. Editorial Freedom
  - C. Peer Review
  - D. Conflict of Interest
    1. Potential Conflicts of Interest Related to Individual Author's Commitments
    2. Potential Conflicts of Interest Related to Project Support
    3. Potential Conflicts of Interest Related to Commitments of Editors, Journal Staff, or Reviewers
  - E. Privacy and Confidentiality
    1. Patients and Study Participants
    2. Authors and Reviewers
  - F. Protection of Human Subjects and Animals in Research

**III. Publishing and Editorial Issues Related to Publication in Biomedical Journals**

- A. Obligation to Publish Negative Studies
- B. Corrections, Retractions and "Expressions of Concern".
- C. Copyright
- D. Overlapping Publications
  1. Duplicate Submission
  2. Redundant Publication
  3. Acceptable Secondary Publication
  4. Competing Manuscripts based on the Same Study
    - a. Differences in Analysis or Interpretation
    - b. Differences in Reported Methods or Results
  5. Competing Manuscripts Based on the Same Database
- E. Correspondence
- F. Supplements, Theme Issues and Special Series
- G. Electronic Publishing
- H. Advertising
- I. Medical Journals and the General Media
- J. Obligation to Register Clinical Trials

**IV. Manuscript Preparation and Submission**

- A. Preparing a Manuscript for Submission to Biomedical Journals
  1. a. General Principles
  - b. Reporting Guidelines for Specific Study Designs
  2. Title Page
  3. Conflict of Interest Notification Page
  4. Abstract and Key Words
  5. Introduction
  6. Methods: a) Selection and Description of Participants.
    - b) Technical Information.
    - c) Statistics
  7. Results
  8. Discussion
  9. References.
    - a) General Considerations Related to References.
    - b) Reference Style and Format
  10. Tables
  11. Illustration (Figures)
  12. Legends for Illustrations (Figures)
  13. Units of Measurements
  14. Abbreviations and Symbols
- B. Sending the Manuscript to the Journal

**V. References**

- A. Print References Cited in this Document
- B. Other Sources of Information Related to Biomedical Journals

**VI. About the International Committee of Medical Journal Editors**

**VII. Authors of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biochemical Journals**

**VIII. Use, Distribution and Translation of the Uniform Requirements**

**IX. Inquires**

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Volumen 59. N° 3, Septiembre 2009

## Contenido

### ARTICULOS GENERALES

<b>Cambios en el índice de masa corporal en adolescentes y adultas entre el embarazo y el posparto</b> <i>María Cecilia Severi T, Rafael Alonso, Eduardo Atalah S.</i> .....	227
<b>Caracterización de un modelo en ratas, útil en el estudio de las consecuencias nutricionales de la diarrea</b> <i>Olga Carolina Aristimuño, Anna María Cioccia, Marlén Gutiérrez, Diamela Carías y Patricio Hevia</i> .....	235
<b>Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos</b> <i>Mayi Agueda, María Ángeles Zulet, José Alfredo Martínez</i> .....	245

### PERSPECTIVA

<b>Intervenciones aleatorias controladas basadas en las escuelas para prevenir la obesidad infantil: revisión sistemática de 2006 a 2009</b> <i>M.E. Pérez-Morales, M. Bacardí-Gascón, A. Jiménez-Cruz y A. Armendáriz-Anguiano</i> .....	253
--	-----

### TRABAJOS DE INVESTIGACION

#### Nutrición Humana

<b>Estado nutricional en la telarquía y menarquía de adolescentes chilenas indígenas y no indígenas</b> <i>Hugo Amigo, Thais Costa Machado, Patricia Bustos</i> .....	260
<b>Estado nutricional de vitamina A en preescolares con padecimientos oculares</b> <i>Emma T. Villaseñor-Fierro, Edgar Vásquez-Garibay, Enrique Romero-Velarde, Miguel Kumazawa-Ichikawa, Salvador Villalpando-Hernández, Ezequiel Vélez-Gómez</i> .....	266

#### Nutrición Infantil

<b>Efecto de una bebida láctea con DHA en la composición de ácidos grasos del glóbulo rojo, de la leche materna y en el recién nacido</b> <i>Eduardo Atalah S, Marcela Araya B, Gastón Rosselot P, Héctor Araya L, Gloria Vera A, Ramón Andreu R, Catalina Barba G, Lorena Rodríguez</i> .....	271
---	-----

#### Nutrición Clínica

<b>Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women</b> <i>Phuong H. Nguyen, Ruben Grajeda, Paul Melgar, Jessica Marcinkevage, Ann M. DiGirolamo, Rafael Flores, Reynaldo Martorell</i> .....	278
---	-----

#### Bioquímica Nutricional

<b>Comparing the impact of chronic energy restriction and vitamin E supplementation on the behavior of adult rats</b> <i>Derlange B. Diniz, Suzana L. de Oliveira, Liana L. Melo, Jaime Amaya-Farfan</i> .....	287
<b>Adiponectina, insulina y glicemia, en individuos con sobrepeso u obesidad sometidos a un régimen de alimentación rico en carbohidratos complejos</b> <i>Dora Cristina González Rodríguez, Liseti Solano R., Julio César González Martínez</i> .....	296

#### Educación en Nutrición

<b>Etapas del cambio relacionadas con el consumo de frutas y verduras, actividad física y control del peso en estudiantes universitarios chilenos</b> <i>María Angélica Mardones H., Sonia Olivares C., Jacqueline Araneda F., Nelly Gómez F.</i> .....	304
--	-----

#### Inocuidad de Alimentos

<b>Diseño de un plan HACCP en el procesamiento industrial de sardinas congeladas</b> <i>Patricia Rosas y Genara Reyes</i> .....	310
--	-----

#### Microbiología de Alimentos

<b>Frecuencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de tomates (<i>Lycopersicon esculentum</i>) y cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>) frescos en tres supermercados de Valencia, Venezuela</b> <i>Luis Guillermo Ramírez Mérida, Alba Morón de Salim, Ana Yudith Alfieri Graterol y Orlando Gamboa</i> .....	318
---	-----

#### Ciencia de Alimentos

<b>Efecto de la adición de harina de soja y concentrado proteico de suero de queso sobre la calidad del pan y la dializabilidad de minerales</b> <i>Alexis N. Visentín, Silvana R. Drago, Carlos A. Osella, María A. de la Torre, Hugo D. Sánchez y Rolando J. González</i> .....	325
<b>Formulación de alimentos para celiacos en base a mezclas de harinas de quínoa, cereales y almidones</b> <i>Valeria Del Castillo, Gerardo Lescano, Margarita Armada</i> .....	332

#### LatinFoods. Composición de Alimentos

<b>Composição lipídica do molusco marinho berbigão <i>Anomalocardia brasiliensis</i> (Gmelin, 1791)“in natura” e cozido</b> <i>Mariana Vincenzi Aveiro, Daniel Barrera-Arellano, Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte</i> .....	337
--	-----

<b>NUEVOS LIBROS</b> .....	342
----------------------------	-----

<b>INFORMACION PARA LOS AUTORES</b> .....	343
---	-----