

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the  
Latin American Society of Nutrition

---

VOL 55

JUNE 2005

N° 2

---

## Contents

	Pages
EDITORIAL .....	109
<b>GENERAL ARTICLES</b>	
<b>Bioactive peptides derived from milk proteins</b> María de Jesús Torres-Llanez, Belinda Vallejo-Cordoba and Aarón Fernando González-Córdova .....	111
<b>RESEARCH PAPERS</b>	
<b>Human Nutrition</b>	
<b>Iron, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies related to anemia in adolescents from a region with a high incidence of congenital malformations in Venezuela</b> Teresa Suárez, Mónica Torrealba, Neifred Villegas, Crisol Osorio and María Nieves García-Casal .....	118
<b>Comparative analysis of body composition assessment methods in healthy men and in chronic obstructive pulmonary disease patients: anthropometry, bioelectrical impedance and dual-energy X-ray absorptiometry</b> Ismael Forte Freitas Júnior, Sérgio Alberto Rupp de Paiva, Irma de Godoy, Suhaila Mahmoud Smaili Santos, Alvaro Oscar Campana .....	124
<b>Profile of breastfeeding in children under 2 years old in the city of Itupeva, SP, Brazil</b> Aurea T. Minagawa, Ida M. V. Oliveira, Elizabeth Fujimori, Daniela Laurenti, Rosali M. J. M. Montero.....	132

## Experimental Nutrition

### **Development and validation of an HPLC method for the quantification of vitamin A in human milk. Its application to a rural population in Argentina**

Laura B. López, Andrea V. Baroni, Viviana G. Rodríguez, Carola B. Greco, Sara Macías de Costa, Silvia Rodríguez de Pece and Patricia Ronayne de Ferrer ..... 140

### **Height deficit in school aged children: a multivariate analysis of possible risk factors, Pernambuco - 1997**

Laurentino GEC, Arruda IKG, Raposo MCF, Batista Filho M. .... 144

## Clinical Nutrition

### **Effect of the diuretic furosemide on urinary essential nutrient loss and on body stores in growing rats**

Yeliza Berné, Diamela Carías, Anna M. Cioccia, Eduardo González, Patricio Hevia ..... 154

## Food Microbiology

### **Identification of *Enterococcus* sp. isolated from raw milk samples coming from the Metropolitan Area of Costa Rica and evaluation of its antibiotic sensibility pattern**

Melania Araya, Gabriela Davidovich, Carolina Chaves and María Laura Arias ..... 161

### **Evaluation of the antimicrobial action of honey against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger***

Heylin Estrada, María del Mar Gamboa, Carolina Chaves and María Laura Arias ..... 167

## LatinFood. Food Composition

### **Amino acid composition of some Mexican foods**

Morales de León Josefina, Bourges Héctor and Camacho Ma. Elena ..... 172

### **Total content and dialyzable iron and zinc in foods from Northern and Southern Mexico**

Rosa Olivia Méndez, Karla Bueno, Nayeli Campos, Daniela López, Carolyn Jane Wyatt and María Isabel Ortega ..... 187

### **Variation of the lipids and fatty acids in marine shrimps consumed in Venezuela**

Tomás Cabrera, Gustavo Cabrera, Jesús Rosas, Aide Velásquez, Marisol Silva ..... 194

**NEW BOOKS** ..... 201

**INFORMATION FOR AUTHORS** ..... 202

## EDITORIAL

**De como “Archivos Venezolanos de Nutrición” pasó a ser “Archivos Latinoamericanos de Nutrición”.**

El Editorial del Número 1, Volumen 1 de “Archivos Venezolanos de Nutrición” AVN, Junio de 1950, fecha en la cual se inicia esta publicación como órgano divulgativo del Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela, lee en sus primeras líneas:

“Con la aparición de Archivos Venezolanos de Nutrición se presenta por primera vez en Venezuela una publicación científica dedicada exclusivamente a la nutrición”.

Desde ese entonces y hasta 1965, AVN publica sin interrupción 29 Números distribuidos en 16 Volúmenes. En 1960, a partir del Volumen X, la revista inicia su Sección Internacional, incorporándose en 1961 un Comité de Redacción Internacional conformado por los Dres. Guillermo Arroyave (Guatemala), Conrado F. Asenjo (Puerto Rico) y Alberto Guzmán Barrón (Perú), el cual se mantiene hasta el Volumen XV, 1965. En ese mismo año en ocasión de celebrarse el I Congreso de Nutrición del Hemisferio Occidental en Chicago, se crea la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN y en Enero de 1966 el Dr. Miguel Octavio Russa, Director del Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela, cede oficialmente la revista AVN a la recién creada SLAN. Aparece así el primer Número de Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN, de portada azul y tamaño 1/16, en Septiembre de 1966 con un Editorial del Dr. Conrado F. Asenjo, Presidente de la primera Junta Directiva de la SLAN.

Entre 1966 y 1978 ALAN es publicado en Venezuela bajo la responsabilidad editorial del Dr. Werner G. Jaffé, de los Dres. Guillermo Arroyave y Mauricio Ruphael Divo, Editores Asistentes y del Dr. José Félix Chávez Pérez como Editor Asociado desde 1967. En 1979 ALAN pasa a Guatemala en donde permanece hasta 1991, período en el cual el Dr. Ricardo Bressani desempeña el cargo de Editor General, acompañado del Dr. J. Edgar Braham como Editor Asistente y de los Dres. Guillermo Arroyave y José Aranda Pastor como Editores Asociados. A partir del Volumen 42, 1992, ALAN es editado otra vez en Venezuela con tamaño ampliado a 1/8 y portada de diseño enteramente nuevo. Los Dres. Virgilio Bosch Román y José Félix Chávez Pérez ocupan los cargos respectivamente, de Editor General y de Editor Asociado. En 1997 el Dr. José Félix Chávez Pérez pasa a ocupar la posición de Editor General y la Dra. Maritza L. de Jiménez la de Editor Asociado, cargos que se mantienen hasta la fecha. Es de destacar que en Junio de 1994 ALAN recibió el Premio Anual “Tulio Arends” otorgado por el CONICIT de Venezuela, a la mejor revista científica y tecnológica nacional y en 1995 la Mención Honorífica al mismo Premio.

Actualmente ALAN recibe un promedio de 9 manuscritos al mes para considerar su publicación y está indexado en Abstract on Hygiene and Communicable Diseases, Chemical Abstracts, Current Contents, Dairy Science Abstracts, Field Crops Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Horticultural Science Abstracts, Index Veterinarius, MEDLINE, Nutrition Abstracts and Reviews, Nutrition Research Newsletter, Ornamental Horticulture, Plant Breeding Abstracts, Rice Abstracts, Seed Abstracts, Veterinary Bulletin y Wheat, Barley and Triticale Abstracts entre otros. ALAN puede bajarse del internet por [www.scielo.org.ve](http://www.scielo.org.ve) y es solicitado por renombradas casas editoriales no solo del Hemisferio Occidental sino de otras regiones del mundo.

Esperamos seguir contando con la colaboración y el apoyo de todos para mantener la excelencia y puntualidad de la revista, la cual después de 55 años de publicación ininterrumpida –primero como AVN y luego como ALAN- es el órgano de divulgación de la SLAN, reconocido a nivel internacional.

*José Félix Chávez Pérez*  
*Editor General*

## Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche

*María de Jesús Torres-Llenez, Belinda Vallejo-Cordoba y Aarón Fernando González-Córdova*

Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos, Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (DTAOA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.). Hermosillo, Sonora. México

**RESUMEN.** Las proteínas lácteas son conocidas por tener propiedades nutricionales, funcionales y biológicas que hacen de ellas ingredientes importantes en alimentos funcionales promotores de la salud. Estas propiedades son parcialmente atribuidas a los péptidos bioactivos codificados en las diferentes proteínas de la leche. Los péptidos bioactivos, son inactivos dentro de la secuencia de la proteína intacta y pueden ser liberados por acción de enzimas proteolíticas nativas de la leche, enzimas de bacterias ácido lácticas o de fuentes exógenas, durante la digestión gastrointestinal o durante el proceso del alimento. Los péptidos derivados de las proteínas caseicas y séricas han demostrado poseer varias propiedades bioactivas como lo son: opioide, antihipertensiva, antimicrobial, inmunomoduladora, transporte de minerales y antitrombótica. Esta revisión presenta una perspectiva de la importancia de las proteínas lácteas en la producción de péptidos bioactivos y sus actividades biológicas, así como de las principales técnicas utilizadas para el aislamiento e identificación de estos péptidos.

**Palabras clave:** Péptido bioactivo, proteólisis, proteínas de la leche.

**SUMMARY. Bioactive peptides derived from milk proteins.** Milk proteins are known for having a wide range of nutritional, functional and biological properties that make them important ingredients in functional or health promoting foods. These properties are partly attributed to bioactive peptides coded in the different milk proteins. Bioactive peptides are inactive within the protein sequence but may be released by the action of native proteolytic enzymes from milk, enzymes from lactic acid bacteria or from exogenous sources or may be produced during gastrointestinal digestion or processing of foods. Peptides derived from caseins and whey proteins were shown to present several bioactive properties such as opioid, antihypertensive, antimicrobial, immunodulatory, mineral carrier and antithrombotic. This overview presents a perspective of the importance of dairy proteins in the production of bioactive peptides and their biological activities, as well as the main analytical techniques that have been used for the isolation and identification of these peptides.

**Key words:** Bioactive peptide, proteolysis, milk proteins..

### INTRODUCCION

La leche contiene elementos nutritivos, da protección inmunológica y suministra sustancias biológicas activas tanto a neonatos como a adultos. En general, las principales fracciones proteicas de la leche de vaca incluyen  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), caseínas (CN), inmunoglobulinas (Ig), lactoferrina (LF), fracciones de péptido-proteosa (estables al calor), fosfoglicoproteínas (solubles en ácido), y proteínas séricas menores tales como: transferrina y albúmina sérica (1). De estas fracciones, los péptidos bioactivos pueden ser generados por proteólisis enzimática, ya sea durante la digestión gastrointestinal o por efecto del proceso de los alimentos (2). El calificativo "bioactivo" es comúnmente utilizado para describir proteínas y péptidos con diversos tipos de actividad biológica. Se ha encontrado que los péptidos bioactivos obtenidos de las proteínas de la leche presentan funciones antimicrobiales, inmunomoduladoras, antitrombóticas y de transporte de minerales. También se ha encontrado que son capaces de disminuir la presión sanguínea de sujetos hipertensos y actuar como opioides (3).

Los péptidos bioactivos se encuentran en la leche, en leches fermentadas, quesos y sueros derivados de quesería (4-8). Las enzimas proteolíticas de la leche, las enzimas provenientes de las bacterias ácido lácticas (BAL) y las provenientes de fuentes exógenas contribuyen a la generación de péptidos bioactivos, prestando particular atención a los péptidos producidos por las proteinasas de las BAL que actúan sobre las proteínas de la leche (9).

Estudios de péptidos bioactivos provenientes de las proteínas lácteas han sido publicados en años recientes (10-13). Se le ha dado un énfasis particular al aislamiento de péptidos bioactivos derivados de diferentes tipos de quesos europeos. Últimamente se ha manifestado interés por la caracterización de quesos de origen latinoamericano (14), así como en el uso de cultivos lácticos iniciadores en la elaboración de los mismos (15,16), sin embargo no existe información del aislamiento de péptidos bioactivos en estos tipos de quesos por lo que este sería un campo de investigación por explorar.

### Proteínas y péptidos bioactivos de la leche

La leche contiene moduladores de funciones gastrointestinales y hemodinámicas, hormonas y factores de

crecimiento, además de cumplir con funciones de inmunoregulación como, la defensa contra enfermedades, y modulación de la población de microorganismos intestinales (17). Una característica importante de la modulación involucra la acción antibacteriana frente a patógenos intestinales, coliformes y la acción prebiótica, estimulando el crecimiento de microflora benéfica en el intestino (10).

La bioactividad de la leche es atribuida a las proteínas y péptidos secretados por las glándulas mamarias, la cual está latente, ausente o incompleta en la proteína nativa. Las estructuras de las secuencias biológicamente activas se han obtenido de la digestión enzimática *in vitro* y/o por digestión gastrointestinal *in vivo* de proteínas precursoras (9,18). Una vez que los péptidos son liberados en el cuerpo, ellos pueden actuar como compuestos reguladores con actividad tipo hormonal (9,13). La actividad biológica está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos presentes. Los péptidos bioactivos usualmente contienen 3 a 20 residuos de aminoácidos por molécula (13).

Las proteínas intactas de la leche presentan gran variedad de actividades biológicas; las inmunoglobulinas tienen un efecto inmunoprotector, la lactoferrina despliegan actividad antibacteriana, mientras que las bajas concentraciones de factores de crecimiento y hormonas, presentes principalmente en calostro, podrían jugar un papel significativo en el desarrollo postnatal (17). Las proteínas de la leche también contienen varias secuencias de péptidos bioactivos los cuales están codificados dentro de la estructura primaria. Varios péptidos derivados de la leche poseen propiedades multifuncionales, por ejemplo, secuencias específicas de péptidos presentan dos o más actividades biológicas. Algunas regiones de la estructura primaria de  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) contienen secuencias sobrepuestas, las cuales presentan diferentes efectos biológicos (9,19).

### Importancia fisiológica de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas

Los péptidos bioactivos están ampliamente distribuidos en las proteínas de la leche, lo cual sugiere la importancia fisiológica de estos péptidos. Aunque la potencia de los péptidos derivados de la leche es menor que la de los péptidos utilizados en fármacos, los primeros podrían tener un efecto fisiológico importante debido a que la ingesta de proteínas lácteas es alta atribuible al consumo de leche y productos lácteos. Para que exista un efecto fisiológico *In vivo*, es necesario que los péptidos bioactivos sean liberados durante la digestión y que alcancen el sitio donde ejercen su acción en el tracto intestinal o después de su reabsorción en los órganos periféricos. Además de que se ha demostrado la formación de estos péptidos bioactivos tanto en digestión *in vivo* como *in vitro*, estos también son liberados durante la elaboración de los productos lácteos (13).

**Péptidos opioides.** Los péptidos opioides típicos son conocidos como endógenos y son derivados de encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Estos actúan como receptores ligandos de opioides. Los efectos fisiológicos de estos péptidos dependen del tipo de receptor: los receptores  $\mu$  están vinculados al control de la motilidad intestinal y comportamiento emocional, los receptores  $\delta$ , al control del comportamiento emocional y los receptores  $\kappa$  están relacionados con analgesia y saciedad (20). Los péptidos opioides atípicos derivados de las proteínas de la leche, son exógenos; pudiendo presentar actividad agonista o antagonista. Los derivados de la CN, son conocidos como casomorfina y/o casoxinas, mientras que los derivados de las proteínas séricas, son conocidos como lactorfinas. Las  $\beta$ -casomorfina son opioides agonistas y son fragmentos de  $\beta$ -CN (fragmento 60-70) y han sido caracterizados como ligandos tipo- $\mu$ . Otras secuencias de opioides agonistas también han sido identificadas en  $\alpha_s$ -CN, -lactalbúmina, y  $\beta$ -lactoglobulina (12,21). Los opioides antagonistas son derivados de la  $\kappa$ -CN (casoxinas) y  $\alpha_{sv}$ -CN (9,12).

Los péptidos opioides atípicos tienen secuencias N-terminales que difieren de los péptidos opioides endógenos típicos (10). La característica estructural común entre péptidos opioides endógenos y exógenos, es la presencia de un residuo tirosina en el amino terminal (excepto opioides derivados de  $\alpha$ -CN) y la presencia de otro residuo aromático (fenilalanina o tirosina), en la tercera o cuarta posición. Esta es una característica estructural importante que permite ajustar al sitio de unión de los receptores opioides. El potencial negativo, localizado en la vecindad del grupo hidroxil fenólico de tirosina, es esencial para la actividad opioide, cuando no está presente resulta en ausencia total de bioactividad (22-23).

**Péptidos con acción antihipertensiva (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina).** Los péptidos antihipertensivos inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (peptidildipeptidasa hidrolasa). ECA es una enzima multifuncional que está localizada en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo esquelético, páncreas, cerebro). Esta enzima puede incrementar la presión sanguínea al convertir angiotensina I (decapéptido) en un potente vasoconstrictor, angiotensina II (octapéptido) (24-26).

Varios péptidos inhibidores de ECA han sido identificados en la digestión proteolítica de proteínas de la leche. Los inhibidores de ECA derivados de CN o casoquinina han sido identificados dentro de las secuencias de  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN. Ellos también han sido derivados por digestión trípica de  $\alpha_{s1}$ -CN y -CN de bovino (10,18). Inhibidores de ECA también han sido obtenidos de leche fermentada "Calpis", la cual es obtenida por la fermentación de leche descremada con *Lactobacillus helveticus* y *Sacharomyces cerevisiae*. Los péptidos que muestran actividad antihipertensiva están formados por Val-

Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, estas secuencias de aminoácidos se encuentran en la estructura primaria de  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN de bovinos, respectivamente (11). También se ha descrito que las proteínas séricas  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG e hidrolizados del suero obtenidos con pepsina, tripsina y quimotripsina, contienen péptidos con acción inhibitoria de ECA (13,27).

Aunque la relación actividad-estructura de los péptidos inhibidores de ECA aun no ha sido establecida, estos péptidos muestran algunas características comunes. La ECA parece tener preferencia por sustratos o inhibidores competitivos con residuos hidrofóbicos (aromáticos o cadenas ramificada) en cada una de las tres posiciones C-terminal. Muchos de los péptidos inhibidores contienen prolina en la posición C-terminal. Casoquininas también contienen lisina o arginina en el residuo C-terminal. La información sobre actividad-estructura sugiere que la carga positiva del grupo guanidino o del grupo  $\epsilon$ -amino de la posición C-terminal de arginina o lisina, respectivamente, contribuyen al potencial inhibitorio (22).

**Agentes inmunomoduladores.** Los péptidos inmunomoduladores presentes en la leche afectan al sistema inmune y a la respuesta de proliferación de células (18,28). Los péptidos inmunoregulatorios obtenidos de  $\beta$ - y  $\alpha_{s1}$ -CN y  $\alpha$ -LA aumentan la fagocitosis y modulan la proliferación y diferenciación de linfocitos. LF intacta o su péptido N-terminal también modula la blastogénesis o diferenciación de linfocitos. Las hormonas, factores de crecimiento y citocinas encontrados en la leche también son importantes en la inmunoregulación y desarrollo inmune (10).

**Péptidos antitrombóticos.** Los péptidos antitrombóticos, las casoplatelinas, son derivadas de la parte C-terminal (caseinoglicomacropéptido) de la  $\kappa$ -CN, inhibiendo la agregación de las plaquetas. Esto es debido a la similitud en la estructura y funcionalidad del dodecapéptido presente en el fibrinogeno humano y el undecapéptido de la  $\kappa$ -CN de bovino (1,18).

A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestra gran similitud. En la leche el mecanismo de coagulación es definido por la interacción de  $\kappa$ -CN con quimosina y el proceso de coagulación de la sangre, es definido por la interacción de fibrogeno con trombina.

**Péptidos transportadores de calcio (caseinofosfopéptidos).** La caseína contiene fosfato que está unido covalentemente vía uniones monoéster a los residuos de serina, el grado de fosforilación depende de la CN particular. Se han identificado varios fosfopéptidos derivados de la caseína que contienen la secuencia -Ser (P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu. Estos caseinofosfopéptidos (CPPs) son liberados por proteólisis, la presencia de múltiples residuos de fosfatos los convierten en

buenos agentes quelantes de calcio (9,29). Los CPPs juegan un papel preponderante en la absorción de calcio en el intestino delgado y su presencia en la cavidad oral promueve la remineralización del esmalte de los dientes.

**Péptidos con actividad antimicrobiana.** Como un complemento al sistema de defensa contra enfermedades e infecciones bacterianas y vírales, un grupo de proteínas y péptidos se encuentran en la leche y secreciones mamarias. Estas incluyen lactoperoxidasa, lisozima, LF y lactoferrina. Su acción antimicrobial puede ser obtenida tanto en la glándula mamaria como en el tracto gastrointestinal de los lactantes (30,31).

Lactoferrina es un péptido catiónico de bajo peso molecular, compuesto por 25 residuos de aminoácidos. Ocho de los 25 residuos de aminoácidos en este péptido son básicos y esta característica probablemente sea importante en determinar sus propiedades bactericidas potentes (22,32). Las propiedades bactericidas parecen estar correlacionadas con la carga positiva neta del péptido, la cual puede matar microorganismos susceptibles ya que incrementa la permeabilidad de la membrana celular ocasionando su ruptura (9,10,33).

LF exhibe actividad bacteriostática y bactericida frente a un gran rango de microorganismos, es una glicoproteína unida a hierro, es bacteriostático debido a su alta afinidad por  $Fe^{3+}$  y bactericida debido a la habilidad de la LF intacta o a la secuencia cercana a N-terminal de lactoferrina humana o de bovino, en una región distinta de los sitios de unión de hierro, llamada lactoferrina (3). Este péptido es obtenido de la degradación de LF de bovino con pepsina y presenta propiedades bactericidas más potentes que LF.

Algunos péptidos que presentan actividad antimicrobiana, también han sido aislados de  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN, así como de  $\alpha$ -LA. La cesecidina, se obtiene por la digestión de CN con quimosina. Este péptido presenta actividad in vitro contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, y *Streptococcus pyogenes* (18). La casocidina-I, es un péptido derivado de  $\alpha_{s2}$ -CN (f165-203) que presenta efectos antibacterianos, inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (9). La isracidina es un segmento de  $\alpha_{s1}$ -CN (f1-23) con actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. La leche también contiene péptidos que exhiben propiedades antifúngicas (3,18).

#### Formación de péptidos bioactivos por BÁL en quesos y suero de quesería

La proteólisis es uno de los fenómenos más importantes que contribuyen al sabor y textura de los diferentes tipos de quesos. Los agentes proteolíticos pueden provenir de diferentes fuentes como: coagulantes de la leche, proteínas

nativas de la leche como plasmina y catepsina D, BAL iniciadoras y no-iniciadoras y sus enzimas (34,35); e iniciadores secundarios, por ejemplo, bacterias ácido propionicas, levaduras, mohos, y sus enzimas (36,37).

La degradación de las proteínas lácteas por proteasas permite la formación de péptidos y aminoácidos, los cuales actúan como compuestos de sabor o como precursores de compuestos del sabor (38-39). Sin embargo, los péptidos liberados de las proteínas alimentarias durante la fermentación, también tienen importancia en la salud ya que pueden propiciar numerosas respuestas fisiológicas en el organismo (9). Estos péptidos bioactivos pueden ser liberados durante la elaboración de productos lácteos (40). Las BAL son conocidas por poseer una variedad de enzimas proteolíticas capaces de utilizar las proteínas como una fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento durante la fermentación (41).

Las BAL son utilizadas en la salud humana ya que su ingestión puede proteger contra varias infecciones virales estimulado al sistema inmune (42,43). En el mismo campo de interés, ha sido mostrado que estas actúan en la prevención de cáncer de colón (44). Los cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea son altamente proteolíticos. Además de las proteinasas enlazadas a la pared celular, al menos 16 peptidasas de BAL han sido identificadas y caracterizadas genéticamente. Este sistema provee un mecanismo de transporte específico para aminoácidos, di- y tripéptidos y oligopéptidos liberados de la molécula proteica. En el tracto intestinal, las enzimas digestivas endógenas y las proteasas liberadas por microorganismos colonizadores del intestino, pueden degradar oligopéptidos permitiendo una posible formación de péptidos con bioactividades específicas. Una vez liberados en el intestino, estos péptidos pueden actuar localmente o pasar a través de la pared intestinal a la circulación sanguínea y alcanzar los órganos, con la subsiguiente regulación fisiológica (2,45).

Los CPPs se pueden formar durante la maduración del queso debido a las proteasas (3-4). La presencia de péptidos con actividad antihipertensiva de varios alimentos se debe a que actúan inhibiendo la ECA (46-48). Laffineur y col. (49) mostraron que las BAL son capaces de liberar péptidos de  $\beta$ -CN con actividad inmunomodulatoria. Un estudio realizado por Pihlanto-Leppälä y colaboradores (13) mostró que los cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas fueron capaces de producir péptidos con actividad inhibitoria de ECA solo después de la digestión de la  $\alpha$ -LA y la  $\beta$ -LG, con pepsina y tripsina (27).

Otros péptidos con potente actividad inhibitoria que no habían sido reportados provinieron de la  $\beta$ -CN y de la  $\alpha_1$ -CN. En un estudio similar, se detectaron péptidos obtenidos de leche fermentada con *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, conteniendo la secuencia de  $\beta$ -lactofina (31). Recientemente, diferentes tipos de quesos como el Gouda,

han sido utilizados como fuente de péptidos con actividad antihipertensiva (6,40). Similarmente, algunos péptidos antihipertensivos como las  $\beta$ -casomorfina, fueron aislados de quesos enzimáticamente modificados (46).

Como se ha mencionado con anterioridad, la hidrólisis de las proteínas de la leche con proteinasas de BAL produce péptidos bioactivos (46,50). El efecto sobre las características sensoriales y químicas que causa el inocular la leche con cultivos iniciadores ha sido ensayado en diferentes tipos de quesos (36,39). Sin embargo, son pocos los datos disponibles acerca del papel que desempeñan los diferentes cultivos iniciadores sobre la producción de péptidos bioactivos (40). En el estudio realizado por Gómez-Ruiz y col. (8) se determinó que la actividad inhibitoria de ECA incrementó con la proteólisis hasta el octavo mes de maduración y empezó a disminuir a los doce meses de maduración del queso Manchego. En este estudio un total de 22 fragmentos de péptidos fueron identificados en nueve fracciones (8).

No solo los quesos son fuentes de péptidos bioactivos, sino también el suero derivado; esto último toma particular importancia debido al incremento del suero como subproducto de la industria quesera (31,51). El suero de bovino contiene proteínas unidas a metales, inmunoglobulinas, factores de crecimiento y hormonas. A varias proteínas del suero se le han atribuido propiedades fisiológicas. Sin embargo, los péptidos bioactivos del suero y sus efectos fisiológicos han sido menos estudiados que los obtenidos de las caseínas. Varios estudios han encontrado secuencias de péptidos con actividad antihipertensiva en proteínas séricas de leche utilizando enzimas digestivas (26) o microbianas o combinación de ambas (27). Los péptidos antihipertensivos también han sido obtenidos por la digestión de proteínas del suero de queso con proteinasa K, obteniéndose un tripéptido a partir de la  $\beta$ -LG (51). Los productos fermentados que presentan péptidos inhibidores de ECA tienen un gran potencial como alimentos funcionales para la prevención de hipertensión.

Algunos de los péptidos obtenidos de proteínas séricas son  $\alpha$ -lactofina,  $\beta$ -lactofina, albutensina A y  $\beta$ -lactensina. Las serorfinas obtenidas de albúmina sérica de bovino presentan actividad opioide. Los péptidos,  $\alpha$ -lactofina,  $\beta$ -lactofina causan la contracción del músculo liso similar a la causada por morfina (52). La literatura menciona que las principales actividades bioactivas del suero son, por un lado, su actividad anticancerosa y, más concretamente, su papel protector frente al cáncer de colon, y por otro lado, su papel como estimulador de la respuesta inmune (53).

En un estudio realizado en queso Emmental se encontró que Catepsina D y proteinasas celulares podrían actuar competitivamente en la degradación de caseínas durante la maduración (54). Se señala que además de la acción de las proteinasas nativas de la leche, los lactobacilos termofílicos presentan un rol significativo en la proteólisis del queso a través

de la acción de sus proteinasas celulares. Estos microorganismos son considerados la especie bacteriana más activa durante la maduración, no solamente debido a su alta actividad proteolítica, sino también debido a su actividad autolítica. Este estudio, también informa que algunas regiones de las caseínas no fueron hidrolizadas, aún cuando eran sitios de ruptura potenciales de las diferentes proteinasas de los lactobacilos, lo que podría estar relacionado a: la modulación de la especificidad de las enzimas del queso por las condiciones fisicoquímicas (pH, actividad de agua, y contenido de minerales y sales) y a la accesibilidad de los sustratos, debido al rearrreglo estructural durante la formación de la matriz caseica y condiciones ambientales en el queso (54,55).

#### Técnicas de aislamiento e identificación de péptidos bioactivos

Los protocolos utilizados para la obtención de péptidos bioactivos consisten en: preparación de extractos acuosos, fraccionamiento por cromatografía por exclusión de tamaño (4,6,27) y HPLC en fase reversa (8,25,46) o electroforesis capilar (6). Para la identificación de la secuencia de los péptidos, se ha utilizado la degradación de Edman o la espectrometría de masas en "tandem" (34).

La actividad potencialmente bioactiva de los péptidos es determinada por comparación de las secuencias encontradas con las reportadas de péptidos bioactivos en bases de datos (55). Aquellos estudios que incluyen la confirmación de la actividad bioactiva de los péptidos *in vivo* o *in vitro*, incluyen a la cromatografía semi-preparativa para la obtención de suficiente material para los ensayos biológicos (6,28,43).

Los protocolos antes descritos, han sido los clásicos, en los cuales las separaciones cromatográficas para el aislamiento y purificación se realizan de manera discontinua. Sin embargo, cuando es necesario realizar una gran cantidad de muestras de manera rápida, el procedimiento descrito no resulta eficiente y se le ha considerado "el cuello de botella" para aquellos que buscan la automatización en el análisis de péptidos. Por estas razones, algunos fabricantes de instrumentación analítica se han enfocado a desarrollar plataformas integradas que abordan el problema de reducir el tiempo de análisis, mientras que otros se han enfocado a mejorar etapas específicas del análisis. Para la identificación sistemática de los péptidos constituyentes en un sistema complejo, las herramientas analíticas que permiten la identificación de las mismas en gran escala y con gran rapidez son la cromatografía bidimensional (2D) como técnica de separación, la espectrometría de masas especializada como técnica de identificación de la secuencia de aminoácidos y la bioinformática para comparar la información estructural generada de la espectrometría de masas a través de las bases de datos (56,57).

Una metodología que presenta ventajas para la separación de péptidos en dos dimensiones, es la cromatografía capilar

de líquidos (2D-LC) con interfase directa con una gran variedad de espectrómetros de masas. Debido a la alta sensibilidad de la LC, y a que todo el análisis es realizado en fase líquida y en línea, estos sistemas (2D-LC-MS) permiten separar hasta péptidos menos frecuentes (56).

Anteriormente, los métodos de identificación de proteínas, consistían en la degradación de Edman y el análisis composicional de aminoácidos, sin embargo ambas metodologías son muy laboriosas y requieren de mucho tiempo. La introducción de los métodos de espectrometría de masas reforzó las estrategias de identificación de péptidos y proteínas; especialmente con el desarrollo del espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) y los métodos de ionización suave, incluyendo el de MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) y la ionización por electroesparado (ESI) (58).

En la identificación de la secuencia de los péptidos por medio de la espectrometría de masas, estos son separados usando cromatografía de líquidos o pueden ser analizados directamente por MS. Los péptidos individuales son separados y fragmentados por colisión con un gas inerte dentro del espectrómetro de masas y las masas de los fragmentos derivados son medidas. La información generada de las masas moleculares se compara con valores teóricos de las bases de datos de péptidos para encontrar la secuencia del péptido e identificar a la proteína enlistada de acuerdo con una exactitud medida estadísticamente por un software especializado (58).

Un método alternativo consiste en la identificación de péptidos usando "tandem" MS y búsqueda en las bases de datos específicas para proteínas. Para este tipo de análisis se utiliza un sistema de cuadrupolo TOF o una trampa de iones. En ambos instrumentos la fragmentación es inducida en una celda de colisión y se miden las masas moleculares de los iones fragmentados. Las masas obtenidas de los iones son comparadas con los valores teóricos de masas de fragmentos de secuencias de proteínas de las bases de datos. Los equipos "tandem" MS en combinación con la cromatografía de líquidos multidimensional permite el análisis eficiente de un gran número de mezclas de péptidos provenientes de la digestión de varias proteínas de sistemas biológicos complejos (58).

## CONCLUSIONES

La leche y derivados lácteos contienen numerosas secuencias peptídicas que determinan funciones fisiológicas importantes y modulan diferentes procesos regulatorios. Las investigaciones realizadas sobre péptidos bioactivos en productos lácteos y derivados indican que, aunque el mecanismo fisiológico de estos péptidos aún no es claro, ofrecen un gran potencial para el desarrollo de alimentos funcionales. Además, la fermentación microbiana es una

tecnología aplicable para la producción de péptidos bioactivos.

Son necesarios trabajos adicionales para establecer la relación estructura-actividad. La investigación en este campo podría aportar al conocimiento de los mecanismos que producen diferentes efectos, así como también las funciones de los péptidos bioactivos derivados de los alimentos.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradecen el apoyo económico recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México a través del proyecto 42340-Z.

### REFERENCIAS

- Xu RJ. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Rev Int.* 1998;14:1-16
- Korhonen H, Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Aust J Dairy Technol.* 2003;5:129-134.
- FitzGerald RJ, Meisel H. Caseinophosphopeptides (CPPs) as functional ingredients. In: *Functional dairy products.* Mattila-Sandholm T, Saarela M, editors. Cambridge UK: Woodhead Publishing Limited; 2003. p.188-202.
- Roudot-Algaron F, LeBars D, Kerhoas L, Einhorn J, Gripon JC. Phosphopeptides from comté cheese: nature and origin. *J Food Sci.* 1994;59:544-547.
- Smacchi E, Gobetti M. Peptides from several italian cheeses, inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 an to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb Technol.* 1998;22:687-694.
- Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *J Dairy Sci.* 2000;83:1434-1440.
- Smacchi E, Gobetti M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 2000;17:129-141.
- Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int Dairy J.* 2002;12:697-706.
- Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J.* 1998;8:363-373.
- Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA, Gherman LI, Willett LB. Milk-borne bioactive peptides. *Int Dairy J.* 1998;8:393-403.
- Takano T. Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int Dairy J.* 1998;8:375-381.
- Meisel H, FitzGerald RJ. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br J Nutr.* 2000;84(Suppl. 1):S27-S31.
- Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.* 2001;11:347-356.
- Van Hekken D, Farkye NY. Hispanic cheeses: the quest for queso. *Food Technol.* 2003;57:32-38.
- Torres-Llanez MJ. Diseño de un cultivo láctico para la biogeneración del sabor de queso fresco regional. [Tesis de Maestría en Ciencias]: Hermosillo, Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.; 2002.
- Vallejo-Córdoba B, Torres-Llanez MJ, Mazorra-Manzano MA, González-Cordoba AF. Starter cultures for hispanic-style cheeses: the case of queso-fresco. *American Dairy Science Association Annual Meeting;* 2003 June 22-26; Phoenix, AZ.
- Tomé D, Dehabbi H. Physiological effects of milk protein components. *Int Dairy J.* 1998;8:383-392.
- Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J Dairy Sci.* 2000; 83:1187-1195.
- Gobetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2002;42:223-239.
- FitzGerald RJ, Meisel H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: *Advances dairy chemistry. Proteins.* Fox PH, McSweeney PLH, editors. Cambridge UK: Academic/Plenum Publishers. 2003b:675-698.
- Antila P, Paakkari I, Järvinen A, Mattila MJ, Laukkanen M, Pihlanto-Leppälä A, Mäntsälä P, Hellman J. Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. *Int Dairy J.* 1991;1:215-229.
- Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Inc Biopoly.* 1997;43:119-128.
- Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopoly.* 1997;43:99-117.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci.* 1995;78:777-783.
- Maeno M, Yamamoto N, Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 1996;79:1316-1321.
- Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int Dairy J.* 1997;7:299-303.
- Pihlanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J.* 1998;8:325-331.
- Heddleson RA, Park O, Allen JC. Immunogenicity of casein phosphopeptides derived from tryptic hydrolysis of  $\beta$ -casein. *J Dairy Sci.* 1997;80:1971-1976.
- FitzGerald RJ. Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int Dairy J.* 1998;8:451-457
- Sánchez L, Peiró JM, Castillo H, Pérez MD, and Ena JM. Kinetics parameters for desnaturation of bovine milk lactoferrin. *J Food Sci.* 1992;57:873-879.
- Belem MAF, Gibbs BF, Lee HB. Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *J Dairy Sci.* 1999;82:486-493.
- Wakabayashi H, Bellamy W, Takase M, Tomita M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *J Food Prot.* 1992;55:238-240.

33. Dionysium DA, Milne JM. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J Dairy Sci.* 1998;80:667-674
34. Gouldsworthy AM, Leaver J, Banks JM. Application of mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in cheddar cheese. *Int Dairy J.* 1996;6:781-790.
35. Martínez-Cuesta MC, Fernández PP, Requena T, Peláez C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei subsp. casei* IFPL731 for flavour development in cheese. *Int Dairy J.* 2001;11:577-585.
36. Lynch CM, McSweeney PLH, Fox PF, Cogan TM, Drinan FD. Manufacture of cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int Dairy J.* 1996;6:851-867.
37. Fox PF, McSweeney PLH. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk.* Law BA, editors. London, UK: Blackie Academic & Professional; 1997. p.1-49.
38. Visser S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J Dairy Sci.* 1993;76:329-350.
39. Gómez MJ, Rodríguez E, Gaya P, Nuñez M, Medina M. Characteristics of manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *J Dairy Sci.* 1999;82:2300-2307.
40. Ryhänen EL, Pihlanto-Leppälä A, Pahkala E. A new type of ripened low-fat cheese with bioactive properties. *Int Dairy J.* 2001;11:441-447.
41. Matar C, Amiot J, Savoie L, Goulet J. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. *J Dairy Sci.* 1996;79:971-979.
42. Perdígón G, Vintiñi E, Alvarez S, Medina M, Medici M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. 1998;82:1108-1114.
43. LeBlanc JG, Matar C, Valdéz JC, LeBlanc J, Perdígón G. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Sci.* 2001;85:2733-2742.
44. Vinderola CG, Prosello W, Reinheimer JA. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. *J Dairy Sci.* 2000;83:1905-1911.
45. Law J, Haandrikman A. Review article: Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 1997;7:1-11.
46. Haileselassie SS, Lee BH, Gibbs B. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J Dairy Sci.* 1999;83:1612-1617.
47. Yamamoto N, Maeno M, Takano T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci.* 1999;82:1388-1393.
48. Leclerc PL, Gauthier SF, Bachelard H, Santure M, Roy D. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int Dairy J.* 2002;12:995-1004.
49. Laffineur E, Genetet N, Leonil J. Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 1996;79:2112-2120
50. Hernández-Ledesma B, Recio B, Ramos M, Amigo L. Preparation of ovine and caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 2002;12:805-812.
51. Abubaker A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci.* 1998;81:3131-3138.
52. Shah NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br J Nutr.* 2000;84(Suppl. 1):S3-S10.
53. Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez A, Bouza JJ. Review articles: Bioactive milk peptides and proteins. *Ars Pharmaceutica.* 2001;42:135-145
54. Gagnaire V, Mollé D, Herrouin M, Léonil J. Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4402-4413.
55. Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D, Iwaniak A. Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung-Food* 1999;43:190-195.
56. Kvasnicka F. Proteomic: general strategies and application to nutritionally relevant proteins. *J Chromatography B.* 2002;77:3-13
57. Soest RV, Schwart H, Mitulovic G, Swart R, Dragan I, Chervet JP. Dual-gradient capillary LC/MS/MS for complex proteomics analysis. LC Packings - A Dionex Company, Sunnyvale, CA, USA. 2003.
58. Yanagida M. Functional proteomics: current achievements. *J Chromatography B.* 2002;771:89-106.

Recibido: 20-01-2005

Aceptado: 06-07-2005

## Deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en relación a anemia, en adolescentes de una zona con alta incidencia de malformaciones congénitas en Venezuela

*Teresa Suárez, Mónica Torrealba, Neifred Villegas, Crisol Osorio y María Nieves García-Casal*

Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" e Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela

**RESUMEN.** Debido a que en años recientes la principal causa de anemia en ciertos grupos de edad parece no ser exclusivamente la deficiencia de hierro, nos propusimos estudiar el efecto de las deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en la aparición de anemia en adolescentes de Venezuela. Cien adolescentes en edades entre 12-19 años participaron en este estudio. Se les realizó un interrogatorio de antecedentes personales y hábitos, examen físico y recordatorio de 24 horas. Se tomó una muestra de sangre para determinar hemoglobina y hematocrito, se separó el suero en el que se determinó la concentración de ferritina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>. La prevalencia de anemia fue de 78% y la de deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> 34.66, 90.9 y 18.18%, respectivamente. El 35.89% de los casos de anemia presentaba deficiencia de hierro, mientras que el 91.02% de las anémicas tenía deficiencia de ácido fólico. Solo el 19.23% de las adolescentes con anemia presentaba deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, pero el total de deficientes de vitamina B<sub>12</sub>, era anémicas. La deficiencia simultánea de hierro y ácido fólico afectó a 30.76% de los casos con anemia. Las altas prevalencias encontradas podrían explicarse por consumo insuficiente y deficientes hábitos nutricionales. La prevalencia de anemia estuvo asociada a la deficiencia de ácido fólico en mayor proporción que a la deficiencia de hierro, como consecuencia de la alta prevalencia de deficiencia de ácido fólico. Las deficiencias encontradas, sobre todo de ácido fólico en este vulnerable grupo de edad, requieren intervención inmediata.

**Palabras clave:** Anemia, ácido fólico, hierro, vitamina B<sub>12</sub>, adolescente.

**SUMMARY.** Iron, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies related to anemia in adolescents from a region with a high incidence of congenital malformations in Venezuela. Since in recent years for certain age groups, the main cause of anemia is not iron deficiency, we intended to study the effect of iron, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies on anemia prevalence in adolescents from Venezuela. One hundred adolescents aged between 12 and 19 years participated in the study. Each subject was interviewed about antecedents and habits and a physical examination and a 24-hour food recall questionnaire were performed. From a blood sample, hemoglobin and hematocrit concentrations were determined and serum was separated for quantification of ferritin, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> concentrations. Prevalence of anemia was 78% and for iron, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies were 34.66, 90.9 and 18.18%, respectively. From anemic cases, 35.89% presented iron deficiency, while 91.02% presented folic acid deficiency. Only 19.23% of adolescents with anemia presented also vitamin B<sub>12</sub> deficiency, but all the cases with vitamin B<sub>12</sub> deficiency, were anemic. Simultaneous iron and folic acid deficiencies affected 30.76% of anemic cases. The high prevalence of deficiencies found in this work could be explained by insufficient intake and inadequate food habits. The prevalence of anemia was associated to folic acid deficiency rather than to iron deficiency, due to the high prevalence of folic acid deficiency. The high prevalence of nutritional deficiencies found in this work, especially regarding folic acid deficiency, require immediate interventions.

**Key words:** Anemia, folic acid, iron, vitamin B<sub>12</sub>, adolescents.

### INTRODUCCION

La deficiencia de hierro es uno de los mayores problemas nutricionales que afecta a millones de personas en el mundo y en una parte importante de los casos la deficiencia es lo suficiente severa para causar anemia (1,2). Desde el punto de vista clínico y del laboratorio, la deficiencia de hierro es usualmente reconocida por la anemia que acompaña sus últimos estadios; es por eso que los riesgos de la deficiencia de hierro son generalmente vistos en términos de la disminución de la hemoglobina circulante.

Las implicaciones no hematológicas de la deficiencia de hierro son muy variadas incluyendo efectos sobre la función y estructura gastrointestinal, inmunidad e infección, función neurológica física, etc (3-8). En relación a la función neurológica, un bajo rendimiento escolar, así como fatiga crónica y otros síntomas inespecíficos han sido atribuidos a la deficiencia de hierro y hay estudios en los que se conecta la deficiencia de hierro, con o sin anemia, a alteraciones en la atención que producen dificultades en el aprendizaje y en la capacidad de los niños para resolver problemas (9-10). Los datos más recientes sobre prevalencia de anemia y deficiencia

de hierro obtenidos en un estudio IVIC-FUNDACREDESA (2004) en la región Centro-occidental del país muestran una prevalencia de 71.4% de anemia y 57.4% de deficiencia de hierro en menores de 2 años. Para niños y adolescentes de esta misma zona, la prevalencia de anemia y deficiencia de hierro resultó en 33% y 27%, respectivamente (datos propios, no publicados).

La deficiencia de ácido fólico tradicionalmente se ha asociado a la anemia macrocítica. Sin embargo, en la actualidad se sabe que deficiencias marginales o alteraciones de su metabolismo se asocian a otras patologías frecuentes como malformaciones congénitas, cáncer y enfermedades cardiovasculares (11-14). Los folatos tienen principalmente dos efectos fisiológicos importantes: son cofactores para enzimas que sintetizan ADN y ARN y son necesarios para la conversión de homocisteína a metionina (15). La magnitud real de la deficiencia de ácido fólico no es bien conocida y la mayoría de las cifras provienen de países desarrollados, aunque comienzan a conocerse datos provenientes de países menos desarrollados.

Por su parte, la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> o cobalamina es poco frecuente y tiene mayor incidencia en los ancianos y en los vegetarianos estrictos (15,16). Generalmente la deficiencia de esta vitamina se reconoce en clínica por su impacto en los sistemas hematopoyético y nervioso, con importante daño en la replicación del ADN. El déficit de vitamina B<sub>12</sub> puede ocasionar daños irreversibles en el sistema nervioso con neuropatía, desmielinización discontinua, difusa y progresiva (17,18). Es interesante señalar, que en años recientes la ingestión de carne roja en los países desarrollados ha disminuido considerablemente y se ha sustituido por carne blanca que es una fuente pobre de cobalamina (19).

Se dispone de poca documentación sobre la deficiencia de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en el ámbito mundial. Esta deficiencia con mucha frecuencia era enmascarada por la severidad y dominio de la deficiencia de hierro. Sin embargo, los datos disponibles actualmente apuntan a que la deficiencia de folato constituye un problema de salud, el cual afecta fundamentalmente a las embarazadas y a las adolescentes, debido al requerimiento aumentado en respuesta a períodos de rápido crecimiento. Algunas investigaciones recientes ponen de manifiesto la repercusión de esta carencia en el estado de salud de la mujer en edad reproductiva (17,20,21).

Históricamente, la prevalencia de deficiencia de hierro a nivel mundial era dos o tres veces mayor que la de anemia en todos los grupos de edad y estratos socioeconómicos. Desde hace unos años, en Venezuela y en otros países en vías de desarrollo, la prevalencia de anemia tiende a hacerse similar, y en algunos casos mayor, que la prevalencia de deficiencia de hierro. Esto se ha observado especialmente en algunos grupos de edad, como los adolescentes, y no ha sido reportado hasta ahora en otros grupos de edad, como embarazadas y

niños menores de 2 años. Este comportamiento parece indicar que otras causas diferentes a la deficiencia de hierro, estén comenzando a tener un rol importante en el desarrollo de la anemia en ciertos grupos etarios.

Debido a este cambio aparente en las causas de anemia, a la interdependencia metabólica entre ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> y a las implicaciones de la deficiencia de estos nutrientes para la salud, en el presente estudio se analiza la prevalencia de anemia en hembras adolescentes y cual es el papel de las deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en su aparición.

## MATERIALES Y METODOS

Este estudio fue realizado en la población de Pedregal, Municipio Democracia, Estado Falcón en el lapso comprendido entre Agosto-Noviembre del 2003. Esta población fue seleccionada debido a estudios previos donde se ha demostrado una alta incidencia de malformaciones congénitas en el Estado Falcón en general y específicamente en ese Municipio. Se incluyó una muestra de 100 adolescentes del sexo femenino, que representa el 48.25% de las estudiantes en edades comprendidas entre 12 y 19 años que acuden a la Unidad Educativa "Carmen Fuguett", la única de esta población. La muestra fue probabilística obtenida por muestreo aleatorio simple.

Se suministró información a las adolescentes y sus representantes sobre los propósitos de la investigación para obtener la firma del consentimiento informado. Posterior a la firma, se llenó un modelo de ficha de recolección de datos donde se recopiló información sobre nombre, edad, grado escolar, historia de salud anterior, y hábitos psicobiológicos entre los que se interrogó sobre uso tabáquico, étlico e ingestión de fármacos haciendo hincapié en el consumo de polivitamínicos y anticonceptivos orales, entre otros. Se evaluaron también los hábitos alimentarios mediante recordatorio de 24 horas y se clasificaron por estrato socioeconómico a través del método Graffar modificado. Posteriormente se realizó el examen físico integral.

La estratificación social por el método de Graffar modificado por Méndez-Castellano, clasifica a los individuos en estratos del I al V de acuerdo a 4 variables: Profesión del jefe de familia, nivel de instrucción de la madre, principal fuente de ingreso familiar y condiciones de vivienda. Los estratos mas desfavorecidos socioeconómico se agrupan en los estratos IV y V.

Los criterios de exclusión incluyeron niñas y mujeres menores de 12 o mayores de 19 años, antecedentes de embarazo, no estar escolarizadas, no firmar el consentimiento informado y haber padecido alguna infección grave en los 3 meses anteriores al estudio.

Se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre por punción venosa, previa limpieza del pliegue de flexión del codo con alcohol isopropílico. La muestra se colocó en 2 tubos, en uno de ellos, con EDTA como anticoagulante, se colocó 1 ml para la determinación de hemoglobina y hematocrito y en el segundo tubo se colocó el resto de la sangre, para obtener por centrifugación el suero en un lapso no mayor de 4 horas después de la extracción. El suero fue almacenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  y protegido de la luz, hasta que fueron trasladados bajo estrictas medidas de conservación de congelamiento y protección de la luz, al Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), donde fueron procesados para determinar niveles séricos de ferritina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>.

La determinación de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> se realizó mediante un radioinmunoensayo enzimático comercial (DPC Diagnostic Product Corporation), que utiliza proteína de captación de folato de alta afinidad (proveniente de leche), para determinar folato y de factor intrínseco para determinar vitamina B<sub>12</sub> por captación competitiva. Es un método radiactivo de alta sensibilidad y especificidad, que no es susceptible a antibióticos y metotrexato en la muestra y que permite determinar simultáneamente folatos y vitamina B<sub>12</sub> (22). La concentración de ambos nutrientes fue obtenida a partir de los contajes radiactivos en contador gamma, calculándola a partir de estándares conocidos.

La determinación de ferritina sérica se realizó por un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA (23), con anticuerpos monoclonales, desarrollado en nuestro laboratorio que presenta una variación intraensayo de 5% y una variación entre ensayos de 7% y ha sido validado contra estándares internacionales, además de realizarse cada plato con controles internos de baja, media y alta concentración de ferritina.

Los puntos de corte usados fueron: para definir deficiencia de hierro, la concentración de ferritina  $< 10 \mu\text{g/L}$  para adolescentes de 12-13.9 años y  $< 12 \mu\text{g/L}$  para adolescentes de 14 años en adelante. Para anemia la concentración de hemoglobina  $< 12 \text{g/L}$ . Para deficiencia de ácido fólico se consideró deficiencia severa las concentraciones séricas menores a 3 ng/ml y deficiencia moderada entre 3 y 6 ng/ml. A menos que se indique de otra forma, en todos los casos en que se hace referencia a prevalencia de deficiencia de ácido fólico, se incluyeron los casos de deficiencia severa y deficiencia moderada, por lo que el punto de corte considerado es  $< 6 \text{ng/ml}$ . Para vitamina B<sub>12</sub>, el punto de corte utilizado para definir deficiencia, fue la concentración sérica menor a 200 pg/ml.

El análisis de resultados se hizo estableciendo las prevalencias de anemia, deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> por separado y luego analizando la prevalencia de anemia en función de la deficiencia de hierro, ácido fólico

y/o vitamina B<sub>12</sub>, a fin de evaluar el impacto de estas deficiencias sobre la aparición de anemia. Además, se clasificaron los casos según edad y estrato socioeconómico y se analizaron los hábitos alimentarios para estimar la ingesta de folatos y hierro en esta población.

## RESULTADOS

Las características antropométricas y hematológicas de las adolescentes estudiadas incluyen una edad promedio de 14.4 años (límites entre 12-19 años), con una estatura promedio de 1.54 mt (1.41-1.74 mt) y un peso de 48.97 kg (22.7-73.5 kg). El índice de masa corporal varió entre 13.8 y 30.2, pero su distribución mostró que la mayoría de las adolescentes presentan una relación peso/talla normal (73% de los casos) encontrándose el 21% en déficit y solo el 6% en exceso. En cuanto a la distribución por estrato socioeconómico, el 2% de las adolescentes fueron clasificadas como estrato II, el 37% como estrato III, el 60% como estrato IV y solo el 1% como estrato V. Para efectos del análisis y por la relativa similitud en sus condiciones los estratos II y III se analizaron juntos, constituyendo el 39% de la muestra, así como los estratos IV y V que representaron el 61% restante. La distribución de los casos en este Municipio, ubicándose la mayoría en los estratos más pobres de la población (IV y V) se asemeja a lo reportado por Fundacredesa (22) a nivel Nacional, aunque el porcentaje de individuos en el estrato III es bastante elevado, mientras que en estrato V es casi inexistente.

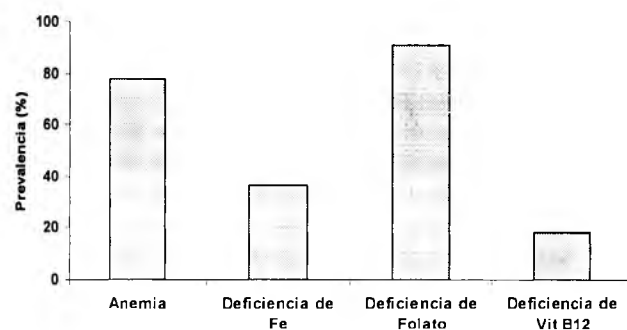
Desde el punto de vista hematológico, las adolescentes mostraron un valor promedio de hemoglobina de 11 g/dL, lo que según el punto de corte de 12 g/dL, las clasifica como un grupo anémico. En términos de ferritina, el promedio del grupo fue de 16.84  $\mu\text{g/L}$ , considerado como adecuado en términos de reservas de hierro, aunque algunos autores clasifican como deficiencia leve los valores entre 13 y 20  $\mu\text{g/L}$ . Los valores séricos para ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> de las adolescentes estudiadas fueron de 3.20 ng/mL y 474.92 pg/mL, respectivamente, lo que significa niveles normales para vitamina B<sub>12</sub>, pero deficiencia moderada para ácido fólico. De hecho, el valor promedio de 3.20 ng/mL se encuentra muy cercano al límite de 3 ng/mL por debajo del cual se considera deficiencia severa.

En la Figura 1, se muestra la prevalencia de deficiencia de los nutrientes estudiados. La prevalencia de anemia fue de 78% y la de deficiencia de hierro 34.69%, mientras que para ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> fue de 90.9% y 18.8%, respectivamente. Es importante resaltar que según el dato anterior, 90 de las 100 muestras evaluadas presentaron algún grado de deficiencia de ácido fólico y la clasificación de los casos como deficiencia severa ( $< 3 \text{ng/mL}$ ) o deficiencia moderada (3-6 ng/mL), mostró que en la mayoría de las

adolescentes (64 de un total de 90) presentaron deficiencia severa de ácido fólico, lo que representa el 71% de los casos con deficiencia (Figura 2) y el 64% del total de casos analizados.

FIGURA 1

Prevalencia de anemia y deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en 100 adolescentes escolarizadas del sexo femenino del Estado Falcón, Venezuela 2003<sup>1</sup>



Puntos de corte:

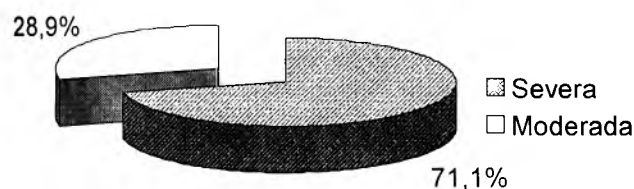
Anemia: hemoglobina < 12 g/L

Deficiencia de hierro: ferritina sérica < 10 µg/L para adolescentes de 12-13.9 años y <12 µg/L para adolescentes de 14 años en adelante

Deficiencia de ácido fólico severa: < 3 ng/ml y moderada: entre 3-6 ng/ml. Deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>: < 200 pg/ml.

FIGURA 2

Distribución de los casos de deficiencia de ácido fólico, según su severidad, en la población estudiada. Estado Falcón Venezuela 2003



Número de casos estudiados = 100

Puntos de corte para deficiencia de ácido fólico

Severa <3ng/ml, Moderada 3-6 ng/ml

Para la distribución de casos por edad, las adolescentes se agruparon en tres categorías 12-13, 14-15 y 16 a 19 años, representando cada grupo el 34%, 39% y 27% de la muestra total estudiada. Pudo observarse que la prevalencia de anemia y deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> mostró una distribución similar entre los diferentes grupos, aunque las deficiencias parecen afectar más a las adolescentes mayores (16 a 19 años) aunque también fue precisamente este grupo en el que la prevalencia de anemia fue menor que en los otros 2 grupos de edades (Tabla 1).

TABLA 1

Prevalencia de anemia, deficiencia de hierro, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en las 100 adolescentes del sexo femenino estudiadas, clasificadas por edad. Venezuela 2003<sup>1</sup>

Edad (años)	n	Anemia	Deficiencia de hierro	Deficiencia de ácido fólico	Deficiencia de vitamina B <sub>12</sub>
		Prevalencia (%)			
12-13	34	85.29	30.30	90.90	18.18
14-15	39	82.05	34.21	87.18	15.38
16-19	27	62.96	40.74	96.30	22.22
Total	100	78.00	34.69	90.91	18.18

<sup>1</sup> Puntos de corte:

Anemia: hemoglobina < 12 g/L

Deficiencia de hierro: ferritina sérica < 10 µg/L para adolescentes de 12-13.9 años y <12 µg/L para adolescentes de 14 años en adelante.

Deficiencia de ácido fólico severa: < 3 ng/ml y moderada: entre 3-6 ng/ml. Deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>: < 200 pg/ml.

En cuanto a la distribución por estrato socioeconómico, como se mencionó se agruparon los estratos II+III y IV+V y se encontró poca variación en las prevalencias de deficiencia al clasificar las adolescentes por este criterio. Por ejemplo la prevalencia de anemia fue 82.05% para los estratos II+III y 75.4% para los estratos IV+V. Asimismo, la prevalencia de deficiencia de hierro fue 35.89% y 32.79%, la de deficiencia de ácido fólico 89.74 y 90.16 y la de deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> 15.38% y 19.67% para los estratos II+III y IV+V, respectivamente.

La Tabla 2 se muestra la prevalencia de anemia asociada a las deficiencias de hierro, ácido fólico y/o vitamina B<sub>12</sub>. Los resultados en esta tabla son expresados en términos de la población total estudiada (100 casos) y en base a las adolescentes que presentaron anemia (78 casos). Como ya se señaló la prevalencia de anemia fue de 78% y se presentó anemia+deficiencia de hierro en 28 casos, lo que constituye 28.6% del total de casos y 35.9% del total de casos con anemia. Al analizar la prevalencia de anemia con deficiencia de ácido fólico se observó que el 91% de las anémicas tuvieron deficiencia de ácido fólico asociada.

La prevalencia de anemia+ deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> afectó al 19.23% de las adolescentes anémicas. Es interesante señalar que todas las adolescentes deficientes en vitamina B<sub>12</sub> eran anémicas (excepto 2), y deficientes en ácido fólico (excepto 1). En el caso de deficiencia de hierro, de 18 adolescentes con deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, 8 presentan simultáneamente deficiencia de hierro. También se analizó la presencia de anemia simultáneamente con deficiencia de hierro y ácido fólico, encontrándose una prevalencia de 30.76%, lo que indica que

casi la totalidad de los casos de anemia+deficiencia de hierro, presentaron además deficiencia de ácido fólico.

Debido al importante papel de la dieta y los hábitos alimentarios en la aparición de estas deficiencias, se realizó un análisis de los alimentos consumidos por estas adolescentes a través de un recordatorio de 24 horas. Como se muestra en la Figura 3, el promedio de raciones por persona al día en todos los renglones analizados, no cubrió las recomendaciones. El consumo de carnes no alcanzó 1 ración/día así como tampoco el de vegetales y frutas. El único grupo que las adolescentes consumieron mas raciones de las recomendadas y que podría cubrir el aporte calórico fueron las grasas y productos clasificados como misceláneos que incluyen la "comida chatarra". El consumo de cereales fue también muy bajo.

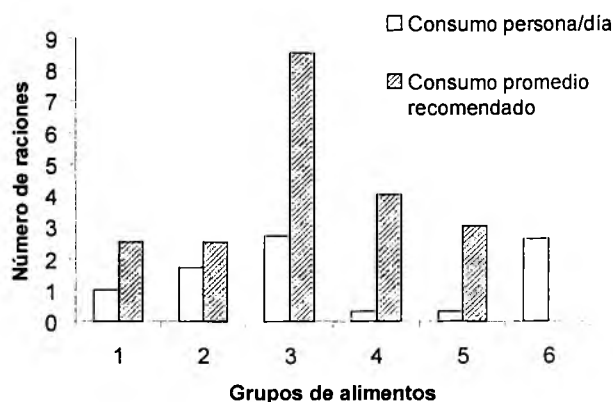
TABLA 2

Presencia de anemia en asociación con deficiencias de hierro, ácido fólico y/o vitamina B<sub>12</sub> en las 100 adolescentes del sexo femenino estudiadas. Venezuela 2003

	n	Prevalencia (%)	
		Sobre 100 casos	Sobre 78 casos
Anemia	78	78.00	
Anemia + Deficiencia de hierro	28	28.57	35.89
Anemia + Deficiencia de ácido fólico	71	71.71	91.02
Anemia + Deficiencia de vitamina B <sub>12</sub>	15	15.15	19.23
Anemia + Deficiencia de ácido fólico + Deficiencia de hierro	24	24.48	30.76

FIGURA 3

Consumo promedio de alimentos según recordatorio de 24 horas en comparación con el consumo recomendado



<sup>1</sup> Grupos de alimentos 1= Leche y productos lácteos. 2= Carnes y huevos 3= Cereales 4= Verduras 5= Frutas 6= Grasas, misceláneos.

## DISCUSION

El grupo de las adolescentes es muy vulnerable a deficiencias nutricionales, especialmente a anemia, deficiencia de hierro y ácido fólico, debido no solo al requerimiento aumentado por el crecimiento sino a las pérdidas menstruales. Esta vulnerabilidad se ve aumentada en el caso de maduradoras tempranas, como en Venezuela donde las niñas alcanzan la menarquia a los 8 años. Estos factores, unidos a desinformación y falta de prevención, hacen que el embarazo en adolescentes sea frecuente en este grupo y que los riesgos de morbo-mortalidad se incrementen tanto para la madre como para el niño.

Los datos reportados en este trabajo muestran el estado nutricional deteriorado en este grupo, especialmente en términos de anemia y deficiencia de ácido fólico. La alta prevalencia de anemia en esta zona, que llega a ser mas del doble de la de deficiencia de hierro, es uno de los principales hallazgos de este trabajo y muestra claramente la presencia de otros factores en la aparición de anemia. Uno de estos factores podría ser la deficiencia de ácido fólico, que mostró afectar a la casi totalidad de las adolescentes estudiadas. La comparación con otros datos a nivel Nacional como un estudio realizado por FUNDACREDESA-IVIC durante 2004 en la región Centro-Occidental del país, revelaron para las hembras adolescentes entre 11 y 15 años una prevalencia de anemia de 33.17%, de deficiencia de hierro 30.81%, de deficiencia de ácido fólico 92% y de vitamina B<sub>12</sub>, 25%. En el Estado Vargas, un estado costero cercano a la región capital que fue estudiado durante 2002, también se encontró una alta prevalencia de deficiencia de ácido fólico entre adolescentes, alcanzando el 96% de los casos estudiados. Los datos indican que la deficiencia de hierro no es la principal causa de la altas prevalencia de anemia en este grupo de edad y que la deficiencia de ácido fólico, junto con otras deficiencias y/o factores ambientales pudiera ser responsable de los resultados obtenidos no solo en esta región sino a nivel Nacional.

Por lo que se desprende del análisis de hábitos alimentarios, a pesar de la limitación que constituye el haber realizado solo 1 recordatorio de 24 horas, se puede inferir un inadecuado consumo proteico, calórico, de vitaminas y minerales, que incluyen los nutrientes analizados en este estudio. Con el bajo consumo de frutas, vegetales y cereales el consumo de ácido fólico fue muy bajo. La fuentes de hierro también fueron limitadas y el bajo consumo de proteínas de origen animal y de ácido ascórbico y vitamina A limitaría la biodisponibilidad del poco hierro ingerido.

Finalmente, resulta interesante señalar que desde 1967 el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) realiza la evaluación de todos los recién nacidos registrados en 100 hospitales, distribuidos en 42 ciudades de 9 países suramericanos, registrándose y

evaluándose todo nacido (vivo o muerto) malformado (25). Para el 2000, el ECLAMC, reportó los datos registrados entre 1982 y 2000, comparando no solo la tasa entre hospitales, sino también, con la frecuencia del ECLAMC. En Venezuela participan 3 hospitales ubicados en las ciudades de Maracaibo, Ciudad Bolívar y Santa Ana de Coro. La tasa mayor de espina bífida ocurrió en Santa Ana de Coro, con 12,1/10 000 nacimientos, seguido de Maracaibo con 11,5/10 000 nacimientos, mientras que el promedio en toda Sudamérica fue de 9,3/10 000 nacimientos. Este estudio reveló que Venezuela tiene una alta prevalencia de malformaciones congénitas, resultando el Estado Falcón con las tasas más altas.

Posteriormente, en un estudio realizado precisamente en el Municipio Democracia del estado Falcón, para determinar factores relacionados con las malformaciones labiopalatinas, encontraron como agentes causales de estos defectos la multifactoriedad, representada en un 56% y el aspecto genético solo un 44% (26). Dentro del aspecto de multifactoriedad se encuentran los factores ambientales que incluyen las deficiencias de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> (27) y como se ha reportado en este trabajo la deficiencia de ácido fólico es muy elevada, lo que no solo podría ser un factor importante en el origen de malformaciones congénitas y otras enfermedades, sino que constituye un problema de salud pública y un factor de riesgo no solo en esta zona sino a nivel nacional.

## REFERENCIAS

- WHO-UNICEF. Indicators and strategies for iron deficiency and anaemia programs. World Health Organization Technical Report. Sep 1993.
- International Anemia Consultative Group (INACG). Guidelines for the eradication of iron deficiency anaemia. A report of the International Nutritional Anaemia Consultative Group. Washington, DC: The Nutrition Foundation, 1977.
- Beutler E, V Fairbanks. The effects of iron deficiency. En: Iron in biochemistry and medicine. Jacobs A, Worwood M (eds). Academic Press. London, 1980, p 393.
- Dallman P. Manifestations of iron deficiency. *Semin Hematol* 1982; 19 : 19-30.
- Gardner G, Edgerton R, Senewiratne B, Barnad J, Ohira Y. Physical work capacity and metabolic stress in subjects with iron deficiency anemia. *Am J Clin Nutr* 1977;30:910-917.
- Cook J, Lynch S. The liabilities of iron deficiency. *Blood* 1986; 68:803-809.
- Strauss R. Iron deficiency, infections and immune function: a reassessment. *Am J Clin Nutr.* 1978;31:660-666.
- Weinberg E. Infection and iron metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1977;30:1485-1490.
- Lozoff B. Iron deficiency and infant development. *J Pediatr.* 1994;125:577-578.
- Walter T, De Andraca I, Chadud P, Perales C. Iron deficiency anemia: Adverse effects on infant psicomotor development. *Pediatrics* 1989;84:7-17.
- Won Choi S, Mason J. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr.* 2000;130:129-132.
- CDC-OPS. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Organización Panamericana de la salud (OPS). La prevención de los defectos del tubo neural con ácido fólico. 2001; p5-16.
- Czeizel A. Folic acid in the prevention of neural tube defects. *J. Pediatr. Gastroenterol* 1995;2: 4-16.
- Medical Research Council. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-137.
- ILSI-OPS. International Life Science Institute (ILSI), Pan American Health Organization (OPS). Ácido fólico y Vitamina B<sub>12</sub>. In: Conocimientos actuales sobre nutrición. Seventh Edition. Ziegler y Filer Eds. Washington DC, USA. 1997; p 235-263.
- Hebert V. Staging vitamin B<sub>12</sub> status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994; 59(Suppl):1213S- 1222S.
- Allen L. Vitamin B<sub>12</sub> metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 352:173-186.
- Rodríguez G. Acido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en la nutrición humana. *Revista Cubana Aliment Nutr* 1998;12(2):107-119.
- Stipanuk M. Folic acid, vitamin B<sub>12</sub> and vitamin B<sub>6</sub>. In: Biochemical and physiological aspects of human nutrition. W.B Saunders Company. Philadelphia 2000; p 483-518.
- Wartanowicz M, Ziemiński S, Bilhak J, Konopla L. Assessment of nutritional folate status and selected vitamin status of women of childbearing age. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:743-747.
- Allen L, Rosado J, Casterline J, Martínez H, López P, Muñoz E, Black A. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency and malabsorption are highly prevalent in rural Mexican communities. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1013-1019.
- DPC Diagnostic Product Corporation. Dualcount Solid Phase No Boil Assay for Vitamin B<sub>12</sub> and Folic Acid. Brochure included with the kit. California USA 1999.
- Flowers C, Kuizon M, Beard S, Skikne B; Covell A, Cook J. A serum ferritin assay for prevalence studies of iron deficiency. *Am J Hematol.* 1986;23:141-151.
- FUNDACREDESA. Indicadores de situación de vida. Movilidad social años 1995-2001. Estudio Nacional. Ministerio de Salud y Desarrollo Social FUNDACREDESA Eds. Caracas, Venezuela. 2001; Págs 5-9.
- Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas "XXXIII Reunión anual del Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas". Agra os reis, Río de Janeiro, Brasil. Febrero 2002.
- Granda M. "Factores epidemiológicos y genéticos asociados a la incidencia y prevalencia de labio y paladar fisurado en la población de Pedregal, Municipio Democracia, Edo. Falcón". Tesis de Grado Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM). Santa Ana de Coro. Venezuela 2001.
- Borja A. Dificultades en los métodos de estudio de exposiciones ambientales y defectos del tubo neural. *Salud Pública de México* 1999;41(2):124-129.

Recibido: 20-02-2005

Aceptado:16-06-2005

## **Análise comparativa de métodos de avaliação da composição corporal em homens saudáveis e em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica: antropometria, impedância bioelétrica e absorptiometria de raios-X de dupla energia**

*Ismael Forte Freitas Júnior, Sérgio Alberto Rupp de Paiva, Irma de Godoy, Suhaila Mahmoud Smali Santos, Alvaro Oscar Campana*

Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Presidente Prudente, Brasil, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Brasil

**RESUMO.** O trabalho teve, como objetivo principal, verificar se a antropometria (ANT) e a impedância bioelétrica (BIA) fornecem resultados concordantes com os obtidos pela absorptiometria de raios-X de dupla energia (DXA), quanto à massa (MG) e à porcentagem de gordura (%GC), à massa livre de gordura corporal (MLG) e ao índice de MLG ( $IMLG = MLG/estatura^2$ ), em indivíduos adultos ( $\geq 50$  anos), do sexo masculino, saudáveis ( $n=23$ ) e em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ( $n=24$ ). As comparações entre as técnicas de composição do corpo foram feitas utilizando ANOVA por medidas repetidas; para análise de concordância, utilizou-se o procedimento de Bland & Altman. Resultados e Conclusões: 1) valores obtidos no grupo saudável foram significativamente diferentes dos observados no grupo com DPOC; 2) não foram observadas diferenças significantes, nos indivíduos saudáveis, entre DXA  $\times$  BIA e entre DXA  $\times$  ANT; em DPOC, a comparação entre DXA  $\times$  BIA revelou, para BIA, valores estatisticamente maiores para MG e %GC e menores para MLG e IMLG; na comparação DXA  $\times$  ANT, não houve diferenças significantes entre as variáveis; 3) a aplicação do teste de Bland & Altman, em ambos os grupos, mostrou falta de concordância na comparação da BIA com DXA e, também, da ANT com DXA; verificou-se, também, superestimação da gordura corporal e subestimação da MLG pela BIA, em relação à DXA.

**Palavras-chave:** Impedância bioelétrica, absorptiometria de raios-X de dupla energia, antropometria, massa livre de gordura, massa de gordura, DPOC.

**SUMMARY.** Comparative analysis of body composition assessment methods in healthy men and in chronic obstructive pulmonary disease patients: anthropometry, bioelectrical impedance and dual-energy X-ray absorptiometry. The aim of this study was to examine the agreement between the results of body fat (BF and BF%), fat-free mass (FFM) and FFM index ( $FFMI = FFM/height^2$ ) as estimated by skinfold anthropometry (ANT), bioelectrical impedance (BIA) and dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) in two groups of men ( $\geq 50$  y), one comprising healthy individuals ( $n=23$ ) and the other, patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) ( $n=24$ ). Comparisons between body composition techniques were done by repeated measures ANOVA; the Bland & Altman procedure was used to analyse agreement. Results and Conclusions: 1) comparison between healthy and COPD groups showed significant differences between all studied variables; 2) in the healthy group, values for BF, BF%, FFM and FFMI were not significantly different when BIA or ANT was compared to DXA; however, in COPD, values for BF and BF% were significantly higher and for FFM and FFMI significantly lower when BIA was compared to DXA; in contrast, no differences were shown between values for these variables when ANT was compared with DXA; 3) Bland & Altman test, in both groups, showed no agreement between BIA and DXA and between ANT and DXA; it was also shown that body fat was overestimated and fat free mass underestimated by BIA in relation to DXA. **Key words:** Bioelectric impedance, dual energy X-ray absorptiometry, anthropometry, fat-free mass, fat mass, COPD.

### **INTRODUÇÃO**

Entre os objetivos importantes dos estudos relacionados com a composição do corpo, ressaltam-se a estimativa do grau

de obesidade e o teor de massa do corpo desprovida de gordura, a massa magra. Nesse contexto, a posição atual é que o índice de massa do corpo é uma estimativa imprecisa da massa de gordura e da massa magra e não fornece informação sobre se as alterações de peso resultam de decréscimo de massa magra ou de aumento de gordura (1). Atualmente, estão disponíveis, para análise da composição do corpo, técnicas relativamente simples, como as que empregam os valores das pregas cutâneas

Este estudo foi parcialmente financiado pelo Curso de Pós-Graduação de Fisiopatologia em Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

e a impedância bioelétrica, e técnicas mais complexas, como a hidrodensitometria, a diluição de isótopos e a absorptometria de raios-X de dupla energia, entre outras (2).

Quanto à antropometria, as pregas cutâneas têm sido utilizadas para avaliação da gordura corporal, tanto na área clínica como na área de saúde pública (3-5). Esta técnica fornece resultados de precisão limitada quando o teor de gordura é calculado a partir da medida de apenas uma prega cutânea (5,6); ocorre, entretanto, melhora da reprodutibilidade dos dados quando os valores de várias pregas são utilizados (4,5).

A impedância bioelétrica tem sido empregada na área clínica nos últimos dez anos. Esta técnica foi também utilizada em estudos populacionais amplos como no Cardiovascular Health Study (7) e no National Health and Nutrition Examination Survey III, desenvolvido nos Estados Unidos, no período de 1988 a 1994 e que incluiu mais de 7000 participantes (8).

A absorptometria de raios-X de dupla energia é um procedimento de avaliação não traumática da composição corporal, que tem sido frequentemente utilizada em investigação e na prática médica na última década, fornecendo informações sobre três compartimentos: massa de gordura, massa livre de mineral e de gordura e massa de mineral ósseo total do corpo (9-13).

No presente trabalho, a composição do corpo foi avaliada em dois grupos de indivíduos do sexo masculino, de 50 anos ou mais: um grupo de indivíduos saudáveis e um grupo de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Três técnicas foram utilizadas para estudo da composição do corpo: antropometria, impedância bioelétrica e absorptometria de raios-X de dupla energia; estas técnicas levaram à estimativa do teor de gordura e da massa livre de gordura do corpo. O principal objetivo do trabalho consistiu em verificar se a antropometria e a bioimpedância elétrica fornecem resultados concordantes com os obtidos pela absorptometria, quanto à gordura e à massa livre de gordura corporal.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados dois grupos de indivíduos do sexo masculino, de idade igual ou acima de 50 anos, um sadio (Grupo Sadio, n=23) e outro, com doença pulmonar obstrutiva crônica (Grupo DPOC, n=24). O grupo sadio foi constituído a partir de funcionários, docentes e moradores da cidade de Botucatu - SP. O grupo com DPOC foi recrutado a partir do cadastro de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital das Clínicas e acompanhados pelo serviço de Pneumologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP. Todos os participantes do estudo foram submetidos à observação clínica, ao exame físico, a exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos de sangue, provas de função pulmonar,

radiografia de tórax e eletrocardiograma em repouso. Tais procedimentos tiveram por finalidade, no grupo sadio, afastar a existência de afecções clínicas, especialmente aquelas que pudessem interferir na composição corporal. O grupo sadio foi composto por indivíduos assintomáticos, que não faziam uso regular de medicações de qualquer espécie e que apresentavam valores das provas de função pulmonar dentro dos limites de normalidade, segundo a American Thoracic Society (14). Quanto ao grupo com doença pulmonar obstrutiva crônica, o diagnóstico da doença de base foi feito por meio de dados de história clínica, exame físico, critérios radiológicos e provas de função pulmonar, de acordo com a Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - 1998 (15). Estas incluíram o volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $VEF_1$  - em litros e em percentual do valor predito), a capacidade vital forçada (CVF - l) e  $VEF_1/CVF$ . A relação  $VEF_1/CVF$  devia estar abaixo de 70% em todos os casos. Faziam parte deste grupo os pacientes que estavam em condições clínicas estáveis na época da realização dos exames, sem apresentar qualquer manifestação de insuficiência cardíaca, não afetados por outras condições que interferissem no estado nutricional, como neoplasias, doenças sistêmicas, renais e hepáticas, *diabetes mellitus* e alcoolismo, e que não recebiam suplementação alimentar.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

### Medida da composição corporal

A composição corporal foi estimada por três técnicas: antropometria (ANT), impedância bioelétrica (BIA) e absorptometria de raios-X de dupla energia (DXA). As medidas antropométricas foram obtidas de acordo com procedimentos descritos por Lohman et al. (16) e incluíram: peso corporal (P), estatura (E), índice de massa corporal ( $IMC=P/E^2$ ) e pregas cutâneas: subescapular-PSE, tricípital-PT, bicípital-PB e supra-ilíaca-PSI. Estas foram medidas com adipômetro modelo Lange, marca Cambridge Scientific Industries, com precisão de 0,2 mm. A estimativa da gordura do corpo, a partir das pregas cutâneas, foi feita de acordo com o procedimento de Durnin & Womersley (3), que utiliza o logaritmo do somatório de quatro pregas cutâneas (PSE, PT, PB e PSI) para cálculo da densidade corpórea e a equação de Siri (17), para estimativa final do percentual de gordura (%GC). A partir deste valor, calcularam-se a massa de gordura (MG) e a massa livre de gordura (MLG), ambas em kg.

A análise da composição corporal pela BIA foi feita com aparelho modelo BIA analyzer - 101A, marca RJA systems, Detroit. O aparelho utiliza corrente elétrica de baixa intensidade (0,8mA) e de baixa frequência (50kHz). Quatro eletrodos foram posicionados no hemitórax direito: dois no dorso da mão (eletrodos transmissores) e dois no dorso do pé (eletrodos receptores), tal como referido por Heyward &

Stolarczyk (18). Por esta técnica, estimaram-se os valores de MLG, MG e %GC. Estes valores foram obtidos a partir de equações incorporadas no próprio equipamento; a equação do aparelho RJL, para massa livre de gordura, foi publicada por Segal et al. (19).

Para estimar a composição corporal pela absorptiometria, foi utilizado o equipamento marca *Hologic* modelo *QDR 2000/Plus* (*Hologic, Waltham*) e o *software* versão 5.56. A técnica consiste na utilização de uma fonte de raios-X e na passagem destes através de filtro de terra rara (cério ou samário), com o que são obtidos fótons com dois níveis de energia (40 e 70 KeV). O feixe de fótons é dirigido para os tecidos, ocorrendo interações entre os elementos constituintes destes e os fótons. Há, então, atenuação de fótons, que varia de acordo com a constituição tecidual local. Isto permite a diferenciação dos tecidos, analisados em detector. No presente trabalho, foram considerados os valores da massa de gordura (MG) e da massa livre de gordura (MLG), que corresponde à soma da massa livre de mineral e gordura + massa de mineral ósseo.

Os valores de MLG, estimados pelas três técnicas, foram utilizados para calcular o índice de massa livre de gordura (IMLG) que corresponde ao valor de MLG dividido pela estatura ao quadrado ( $MLG/E^2$ )

#### Análise estatística

Os dados obtidos são expressos na forma de médias e medidas de dispersão. Para a comparação de médias, utilizou-se o teste *t* de Student para amostras independentes.

Para a comparação das técnicas, utilizaram-se, como referência, os valores obtidos pela DXA; desta maneira, compararam-se DXA x ANT e DXA x BIA. Os procedimentos estatísticos adotados foram: 1) análise de variância de medidas repetidas, com comparação entre as médias, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunnett; a significância foi estabelecida em  $P < 0,05$ ; 2) método de concordância de Bland & Altman (20), que permitiu estabelecer os limites de concordância entre os resultados relacionados à composição corporal, obtidos por duas técnicas diferentes.

## RESULTADOS

Na Tabela 1, os valores relacionados à composição do corpo foram obtidos por absorptiometria. O grupo sadio era formado por indivíduos mais jovens, de peso maior e com valor médio de IMC significativamente maior que o grupo com DPOC. Apresentavam, também, valores das provas de função pulmonar significativamente mais altos que o grupo de pacientes. Quanto ao IMC, verificaram-se valores acima de  $25,0 \text{ kg/m}^2$  em 17 dos 23 indivíduos sadios e nenhum valor abaixo de  $20,0 \text{ kg/m}^2$ , ao passo que em nove dos 24 pacientes com DPOC esses valores foram menores que  $20,0 \text{ kg/m}^2$  e,

em apenas três casos, os valores foram maiores que  $25,0 \text{ kg/m}^2$ . Os grupos diferiram, ainda, quanto à gordura corporal, expressa em porcentagem, à massa livre de gordura e ao índice de massa livre de gordura, cujos valores foram significativamente menores nos pacientes com DPOC.

TABELA 1  
Valores médios e desvios-padrão de idade, variáveis antropométricas e provas de função pulmonar nos grupos de estudo

Variáveis	Grupos de estudo	
	Sadio n = 23	DPOC n = 24
Idade (anos)	57,8 + 7,9	63,8 + 8,2**
Peso do corpo (kg)	75,0 + 9,6	58,2 + 8,7**
Estatura (cm)	168,2 + 6,6	165,6 + 6,8
IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	26,5 + 3,2	21,2 + 3,1**
GC * (%)	24,1 + 6,2	20,3 + 6,9**
MLG * (kg)	56,6 + 6,7	46,1 + 5,7**
IMLG * ( $\text{kg/m}^2$ )	20,0 + 2,0	16,8 + 1,9**
VEF <sub>1</sub> (%)	108,6 + 15,0	34,9 + 14,1**
VEF <sub>1</sub> /CVF (%)	77,5 + 3,0	36,8 + 9,1**

IMC = índice de massa corporal; GC = porcentual de gordura corporal; MLG = teor de massa livre de gordura corporal; IMLG = massa livre de gordura/estatura<sup>2</sup>; VEF<sub>1</sub> = volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF = capacidade vital forçada; VEF<sub>1</sub>/CVF = volume expiratório forçado no primeiro segundo dividido pela capacidade vital forçada. \* Valores das variáveis relacionadas à composição do corpo obtidos por absorptiometria. \*\* = valores do Grupo DPOC significativamente diferentes do Grupo Sadio ( $P < 0,05$ ).

#### Comparação das técnicas

Na Tabela 2, estão registrados os valores médios e os desvios-padrão das variáveis estimadas pelas três técnicas, nos indivíduos sadios. As comparações das médias não revelaram diferenças significantes entre os resultados da BIA em relação à DXA e também da ANT em relação à DXA.

Na Tabela 3, estão registrados os valores médios e os desvios-padrão das variáveis estimadas pelas três técnicas, nos pacientes com DPOC. A análise de variância, complementada com teste de Dunnett, revelou haver diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os valores obtidos pela BIA em relação à DXA; assim, os valores de MG e %GC foram maiores e os valores de MLG e IMLG, menores, quando estimados pela BIA, em relação à DXA. Os valores estimados pela ANT não foram significativamente diferentes daqueles obtidos pela DXA.

TABELA 2  
Valores médios + desvios-padrão das variáveis da composição corporal do grupo de indivíduos saudáveis

Variáveis	Técnicas de estudo			P
	DXA	BIA	ANT	
MG (kg)	18,4 ± 6,3	20,1 ± 5,2	18,4 ± 8,5	ns
GC (%)	24,1 ± 6,2	26,5 ± 4,9	24,3 ± 8,4	ns
MLG (kg)	56,6 ± 6,7	54,9 ± 6,4	56,6 ± 4,9	ns
IMLG (kg/m <sup>2</sup> )	20,0 ± 2,0	19,4 ± 2,1	20,5 ± 1,5	ns

DXA = absorptiometria de raios-X de dupla energia; BIA = impedância bioelétrica; ANT = antropometria; MG = teor de massa de gordura; GC = percentual de gordura corporal; MLG = teor de massa livre de gordura corporal; IMLG = índice de massa livre de gordura corporal; valor de P para a análise de variância; ns = não significante.

TABELA 3  
Valores médios ± desvios-padrão das variáveis da composição corporal do grupo de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica

Variáveis	Técnicas de estudo			P
	DXA	BIA	ANT	
MG (kg)	12,0 ± 5,4	13,7 ± 4,3*	11,9 ± 5,3	0,005
GC (%)	20,3 ± 6,9	23,3 ± 5,4*	19,9 ± 6,9	0,002
MLG (kg)	46,1 ± 5,7	44,6 ± 6,3*	46,2 ± 5,3	0,010
IMLG (kg/m <sup>2</sup> )	16,8 ± 1,9	16,3 ± 1,9*	16,8 ± 1,6	0,017

DXA = absorptiometria de raios-X de dupla energia; BIA = impedância bioelétrica; ANT = antropometria; MG = teor de massa de gordura; GC = percentual de gordura corporal; MLG = teor de massa livre de gordura corporal; IMLG = índice de massa livre de gordura corporal; valor de P para a análise de variância; \* = valores diferentes estatisticamente (P<0,05) em relação aos obtidos pela DXA.

### Análise de concordância

Os resultados do estudo da concordância (DXA x BIA e DXA x ANT), relacionado ao percentual de gordura e à massa livre de gordura, expressa em kg, são apresentados graficamente nas Figuras 1 e 2.

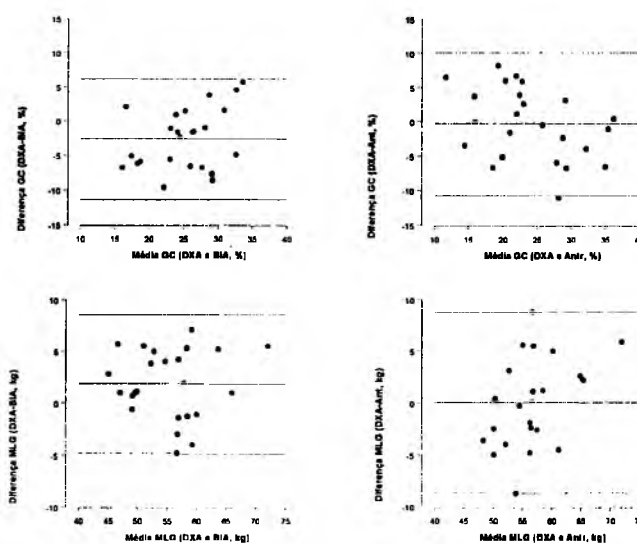
### Grupo Sadio

Quanto à gordura corporal, na comparação de DXA x BIA, os vieses negativos (-1,7kg para MG e -2,3% para %GC), indicam que as estimativas da gordura foram maiores pela BIA em relação à DXA; os limites de concordância variaram de 5,0 a -8,4kg para MG e de 6,2 a -10,8% para %GC. Na comparação de DXA x ANT, embora os vieses apresentassem valores baixos (-0,03kg para MG e -0,1% para %GC), os limites de concordância variaram de 8,7 a -8,7kg para MG e de 10,4 a -10,6% para %GC.

Em relação à massa livre de gordura e ao índice de massa livre de gordura, as comparações de DXA x BIA apresentaram vieses positivos (1,7kg para MLG e 0,6kg/m<sup>2</sup> para IMLG), indicando que a BIA apresenta valores menores em relação à DXA. Quanto aos limites de concordância, variaram de 8,3 a -5,0kg para MLG e de 2,9 a -1,8 kg/m<sup>2</sup> para IMLG. Na comparação de DXA x ANT, os vieses apresentaram valores baixos (0,05kg para MLG e -0,4 kg/m<sup>2</sup> para IMLG) e os limites de concordância variaram de 8,8 a -8,7kg para MLG e de 1,6 a -2,5 kg/m<sup>2</sup> para IMLG.

FIGURA 1

Avaliação da concordância no grupo de indivíduos saudáveis entre: porcentagem de gordura estimada pela absorptiometria e bioimpedância (A); porcentagem de gordura estimada pela absorptiometria e antropometria (B); massa livre de gordura estimada pela absorptiometria e bioimpedância (C) e massa livre de gordura estimada pela absorptiometria e antropometria (D)

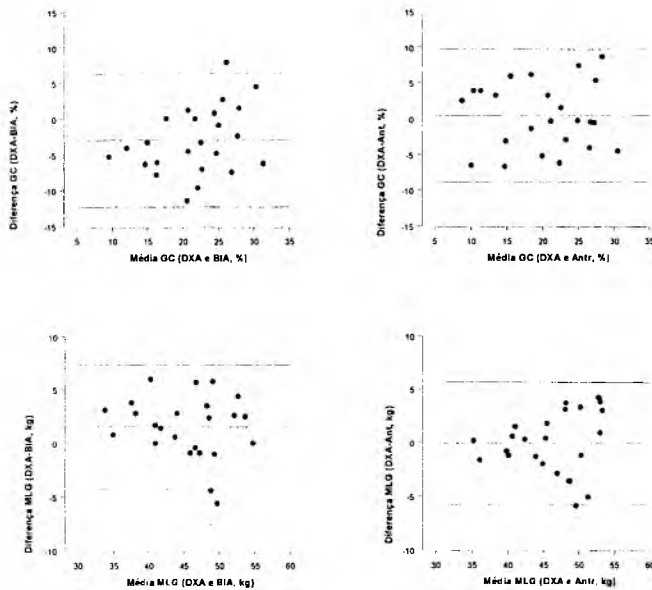


### Grupo DPOC

A comparação de DXA x BIA revelou vieses negativos (-1,6kg para MG e -3,0% para %GC), que indicam que as estimativas da gordura corporal foram maiores pela BIA em relação à DXA. Quanto aos limites de concordância, variaram de 3,8 a -7,1kg para MG e de 6,2 a -12,3% para %GC. Na comparação de DXA x ANT, semelhante ao que foi observado no grupo de indivíduos saudáveis, os vieses apresentam valores baixos (-0,1kg para MG e 0,4% para %GC) e os limites de concordância variaram de 5,8 a -5,6kg para MG e de 9,7 a -8,9% para %GC.

FIGURA 2

Avaliação da concordância no grupo de indivíduos com DPOC entre: porcentagem de gordura estimada pela absorptiometria e bioimpedância (A); porcentagem de gordura estimada pela absorptiometria e antropometria (B); massa livre de gordura estimada pela absorptiometria e bioimpedância (C) e massa livre de gordura estimada pela absorptiometria e antropometria (D)



As comparações entre as variáveis massa livre de gordura e índice de massa livre de gordura revelaram, na comparação de DXA x BIA, vieses positivos (1,5kg para MLG e 0,6kg/m<sup>2</sup> para IMLG) e indicam que a BIA apresenta valores menores em relação à DXA. Quanto aos limites de concordância, variaram de 7,4 a -4,3kg para MLG e de 2,8 a -1,7 kg/m<sup>2</sup> para IMLG. Na comparação de DXA x ANT, os vieses apresentaram valores baixos (-0,1kg para MLG e 0,01 kg/m<sup>2</sup> para IMLG) e os limites de concordância variaram de 5,6 a -5,8 kg para MLG e de 2,1 a -2,1 kg/m<sup>2</sup> para IMLG.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizou-se a absorptiometria para comparação do grupo de doentes com o grupo sadio e para a análise da comparação das técnicas e de sua concordância. Isto deve-se aos fatos de que, além de ter sido usada para validação de técnicas como a antropometria e a impedância bioelétrica (21-23), a absorptiometria tem fornecido resultados concordantes, quanto à gordura e à massa livre de gordura corporal, com técnicas de referência consideradas como padrão-ouro, na área experimental e em indivíduos adultos

sadios de ambos os sexos e em doentes com paralisia cerebral e DPOC (24-27). Nessa mesma linha, investigações recentes mostraram que as estimativas de gordura e de massa livre de gordura do corpo, pela absorptiometria, são quase idênticas a aquelas obtidas por modelos complexos de análise compartimental (28) e pela ressonância magnética (29).

Quanto à impedância bioelétrica, os dados fornecidos por esta técnica, não constituem medidas diretas de qualquer estrutura biológica de interesse, como, por exemplo, gordura ou massa muscular. Nesta técnica, as estimativas são obtidas a partir de equações empíricas que fornecem valores para a água total do organismo, e, então, o teor de massa magra e o teor de gordura, num modelo de dois compartimentos. Assim, no que concerne à composição do corpo, avaliada pela impedância, inúmeras equações foram desenvolvidas, considerando sexo, idade, estatura e, também, doenças (21,23). Desta maneira, a aplicação de equações diferentes pode ensejar resultados diferentes quanto à massa de gordura e à massa livre de gordura do corpo. Pichard et al. (21), por exemplo, mostraram que a aplicação de diferentes fórmulas de impedância fornece, para a massa de gordura, valores menores (até 10,6 ± 10,2 kg) e valores maiores (até 19,8 ± 8,8 kg), em relação ao valor de 17,9 kg, estimado em mulheres, pela absorptiometria. No presente trabalho, o valor do teor de gordura registrado foi baseado na equação incorporada no próprio aparelho que foi utilizado para a medida dos compartimentos corporais.

## Composição do corpo no grupo sadio e no grupo com DPOC

Os resultados relativos à composição do corpo, no grupo sadio, são semelhantes a dados publicados na literatura. De fato, quanto à porcentagem de gordura, Gallagher et al. (30) citam valores de 25,1 a 30,1% para homens sadios de 60 a 79 anos, com IMC variando de 25 a 30 kg/m<sup>2</sup> e, quanto à massa livre de gordura, os resultados registrados variam de 49,5 a 58,0 kg, também para homens de mais de 60 anos (9,24).

Nos pacientes com DPOC, valores publicados de gordura corporal são variáveis (13,31), mas podem ser baixos (10). Quanto à estimativa da massa livre de gordura, há registro de valores baixos, de 39,3kg (32), e valores mais altos, de 50,2 ± 8,7kg (24). No presente trabalho, os valores de MLG, nos pacientes com DPOC, foram 46,1 ± 5,7kg (Tabela 1), situando-se, portanto, dentro de limites observados em publicações da literatura. Quanto ao IMLG, utilizando o ponto de corte de 17,4 kg/m<sup>2</sup>, como publicado por Pichard et al. (33), o valor médio dos indivíduos sadios é normal; o valor médio dos pacientes com DPOC é menor que 17,4, correspondendo, pois, a índice de massa livre de gordura baixo (IMLG < 17,4 kg/m<sup>2</sup> em 17 dos 24 pacientes).

### Comparação das técnicas de análise da composição corporal e estudo da concordância entre as técnicas

A análise de variância não revelou, nos indivíduos saudáveis, diferenças significativas entre os resultados relacionados às três técnicas utilizadas (Tabela 2). No grupo de pacientes com DPOC, porém, há diferença entre os resultados da impedância bioelétrica, quando comparados à absorptiometria, a impedância superestimando o compartimento de gordura e subestimando a massa corporal magra (Tabela 3). Os valores da gordura corporal, obtidos por impedância, nos pacientes com DPOC, podem ter sofrido influência da menor quantidade de gordura corporal (menores valores de IMC e %GC, conforme Tabela 1) e por isso apresentam-se superestimados na comparação com DXA. Nesta linha, em trabalho recente, Sun et al. (34) mostraram que a bioimpedância fornece valores altos de gordura corporal em indivíduos saudáveis classificados pela DXA como magros e valores mais baixos nos indivíduos classificados como obesos.

Quanto ao estudo da concordância, os resultados relacionados com a massa e a porcentagem de gordura do corpo, em indivíduos saudáveis e em DPOC, mostraram valores pequenos de viés nas comparações DXA x BIA, porém com limites de concordância relativamente largos, indicando falta de concordância entre os métodos. Pela impedância bioelétrica, os vieses foram negativos, indicando superestimação da gordura e, conseqüentemente, subestimação da massa livre de gordura (Figuras 1 e 2), achados coincidentes com os resultados da comparação dos métodos pela análise da variância. Em pacientes com DPOC, Steiner et al. (22) também observaram subestimação da massa livre de gordura e superestimação da gordura corpórea pela impedância, em relação à absorptiometria. No tocante à massa livre de gordura e ao índice de massa livre de gordura, embora os limites de concordância não tenham sido largos, os vieses, em indivíduos saudáveis e em DPOC, também indicam menor concordância entre os métodos.

Com relação à antropometria, nos indivíduos saudáveis e nos pacientes com DPOC, não encontramos diferenças significativas entre os valores de MG, %GC, MLG e IMLG estimados por essa técnica e pela absorptiometria (Tabelas 2 e 3). Note-se que os valores obtidos pela antropometria quase se justapõem aos da absorptiometria, tanto em indivíduos saudáveis, quanto em pacientes com DPOC. Embora seja método considerado como de sensibilidade menor para detectar, por exemplo, depleção nutricional (22), a medida de pregas cutâneas, realizada por pessoa experiente, com técnica padronizada, fornece estimativas consideradas confiáveis e com acurácia da porcentagem de gordura corporal (35).

No estudo de concordância entre os dados antropométricos e dados obtidos pela absorptiometria, verificaram-se, para MG, %GC, MLG e IMLG, valores médios quase superponíveis, com vieses de valor baixo; contudo, também aqui, os limites

de concordância são amplos, o que compromete o uso intercambiável desses métodos, para análise da composição do corpo de indivíduos (Figuras 1 e 2).

Levando em consideração as diferenças assinaladas entre DXA e BIA e DXA e ANT, poder-se-ia utilizar um fator de correção para ajuste dos valores relacionados aos compartimentos do corpo. O fator de correção poderia corresponder ao valor do viés, tal como calculado pelo método de Bland & Altman (20). Entretanto, considerando que, no presente trabalho, os limites de concordância são relativamente largos, os resultados perderiam precisão, tornando-se pouco confiáveis.

As considerações acima expostas são válidas nas condições que se enquadram dentro do delineamento do trabalho desenvolvido, isto é, para indivíduos do sexo masculino, de 50 a cerca de 80 anos de idade, saudáveis e portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica e cujos espaços compartimentais foram estimados pelos equipamentos descritos, nas condições registradas.

### CONCLUSÕES

Em conclusão, a análise do grupo de indivíduos saudáveis mostrou não haver diferença entre os resultados da antropometria ou da impedância quando comparados com os da absorptiometria; em contraste, no grupo com DPOC, houve diferença entre os resultados da impedância em relação aos da absorptiometria. Adicionalmente, em análises individuais, em ambos os grupos estudados, não houve concordância entre as estimativas da composição corporal obtidas pela antropometria ou pela impedância em relação à absorptiometria.

### AGRADECIMENTOS

Ao Professor Assistente Doutor José Morceli, pelo acesso à Unidade TC Tomocentro de Botucatu, e ao Professor Assistente Altamir Santos Teixeira, pela realização e interpretação da maioria dos exames de absorptiometria.

### REFERÊNCIAS

1. Kyle UG, Genton L, Pichard C. Body composition: what's new. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002; 5: 427-433.
2. Heymsfield SB, Wang ZM, Baumgartner RN, Ross R. Human body composition: advances in models and methods. *Annu Rev Nutr*. 1997; 17: 527-558.
3. Durnin JVGA, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr*. 1974; 32: 77-97.
4. Hammond J, Rona RJ, Chinn S. Estimation in community surveys of total body fat of children using bioelectrical impedance or skinfold thickness measurements. *Eur J Clin Nutr*. 1994; 48: 164-171.

5. Schaefer F, Georgi M, Zieger A, Scharer K. Usefulness of bioelectric impedance and skinfold measurements in predicting fat-free mass derived from total body potassium in children. *Pediatr Res.* 1994; 35: 617-624.
6. Roche AF, Sievogel RM, Chumlea WC, Webb P. Grading body fatness from limited anthropometric data. *Am J Clin Nutr.* 1981; 34: 2831-2838.
7. Visser M, Langlois J, Guralnik JM, Cauley JA, Kronmal RA, Robbins J, Williamson JD, Harris TB. High body fatness, but not low fat-free mass, predicts disability in older men and women: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 584-590.
8. Zhu S, Wang Z, Shen W, Heymsfield SB, Heshka S. Percentage body fat ranges associated with metabolic syndrome risk: results based on the third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 228-235.
9. Poehlman ET. Special considerations in design of trials with elderly subjects: unexplained weight loss, body composition and energy expenditure. *J Nutr.* 1999; 129: 260S-263S.
10. Yoshikawa M, Yoneda T, Kobayashi A, Fu A, Takenaka H, Narita N, Nezu K. Body composition analysis by dual energy X-ray absorptiometry and exercise performance in underweight patients with COPD. *Chest.* 1999; 115: 371-375.
11. Song MY, Ruts E, Kim J, Janumala I, Heymsfield S, Gallagher D. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 874-880.
12. Schwenk A, Hodgson L, Wright A, Ward LC, Rayner CF, Grubnic S, Griffin GE, Macallan DC. Nutrient partitioning during treatment of tuberculosis: gain in body fat mass but not in protein mass. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 1006-1012.
13. Schols AM. TNF-alpha and hypermetabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Nutr.* 1999; 18: 255-257.
14. American Thoracic Society. Role of the pulmonary and critical care medicine physician in the American health care system. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 2199-2201.
15. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 1256-1276.
16. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric Standardization Reference Manual. Champaign, IL: Human Kinetics. 1988, 177 p.
17. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density, analysis of methods. In: *Techniques for measuring body composition*, edited by Brozek J and Henschel A. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1961, p. 223-244.
18. Heyward VH, Stolarczyk LM. Applied Body Composition Assessment. Champaign, IL: Human Kinetics. 1996, 88 p.
19. Segal KR, Van Loan M, Fitzgerald PI, Hodgdon JA, Van Itallie TB. Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four-site cross-validation study. *Am J Clin Nutr.* 1988; 47: 7-14.
20. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986; 1: 307-310.
21. Pichard C, Kyle UG, Janssens JP, Burdet L, Rochat T, Slosman DO, Fitting JW, Thiebaud D, Roulet M, Tschopp JM, Landry M, Schutz Y. Body composition by X-ray absorptiometry and bioelectrical impedance in chronic respiratory insufficiency patients. *Nutrition.* 1997; 13: 952-958.
22. Steiner MC, Barton RL, Singh SJ, Morgan MD. Bedside methods versus dual energy X-ray absorptiometry for body composition measurement in COPD. *Eur Respir J.* 2002; 19: 626-631.
23. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gomez JM, Heitmann BL, Kent-Smith L, Melchior JC, Pirlich M, Scharfetter H, Schols AM, Pichard C. Bioelectrical impedance analysis—part I: review of principles and methods. *Clin Nutr.* 2004; 23: 1226-1243.
24. Engelen MP, Schols AM, Heidendal GA, Wouters EF. Dual-energy X-ray absorptiometry in the clinical evaluation of body composition and bone mineral density in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 1298-1303.
25. Bertin E, Ruiz JC, Mourot J, Peiniau P, Portha B. Evaluation of dual-energy X-Ray absorptiometry for body-composition assessment in rats. *J Nutr.* 1998; 128: 1550-1554.
26. Barrera MG, Salazar G, Gajardo H, Gattas V, Coward A. Comparative analysis of body composition assessment methods in healthy adult men. *Rev Med Chil.* 1997; 125: 1335-1342.
27. Hildreth HG, Johnson RK, Goran MI, Contompasis SH. Body composition in adults with cerebral palsy by dual-energy X-ray absorptiometry, bioelectrical impedance analysis and skinfold anthropometry compared with <sup>18</sup>O isotope-dilution technique. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66: 1436-1442.
28. Cameron N, Griffiths PL, Wright MM, Blencowe C, Davis NC, Pettifor JM, Norris SA. Regression equations to estimate percentage body fat in African prepubertal children aged 9 y. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 70-75.
29. Jones A, Jr., Shen W, St-Onge MP, Gallagher D, Heshka S, Wang Z, Heymsfield SB. Body-composition differences between African American and white women: relation to resting energy requirements. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 780-786.
30. Gallagher D, Ruts E, Visser M, Heshka S, Baumgartner RN, Wang J, Pierson RN, Pi-Sunyer FX, Heymsfield SB. Weight stability masks sarcopenia in elderly men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279: E366-375.
31. Godoy I, Castro e Silva MH, Togashi RH, Geraldo RCC, Campana AO. Is chronic hypoxemia in patients with chronic obstructive pulmonary disease associated with more marked nutritional deficiency? A study of fat free mass evaluated by anthropometry and bioelectrical impedance methods. *J Nutr Health Aging.* 2000; 4: 102-108.
32. Ferreira IM, Verreschi IT, Nery LE, Goldstein RS, Zamel N, Brooks D, Jardim JR. The influence of 6 months of oral anabolic steroids on body mass and respiratory muscles in undernourished COPD patients. *Chest.* 1998; 114: 19-28.
33. Pichard C, Kyle UG, Morabia A, Perrier A, Vermeulen B, Unger P. Nutritional assessment: lean body mass depletion at hospital admission is associated with an increased length of stay. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 613-618.

34. Sun G, French CR, Martin GR, Younghusband B, Green RC, Xie YG, Mathews M, Barron JR, Fitzpatrick DG, Gulliver W, Zhang H. Comparison of multifrequency bioelectrical impedance analysis with dual-energy X-ray absorptiometry for assessment of percentage body fat in a large, healthy population. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 74-78.
35. Yao M, Roberts SB, Ma G, Pan H, McCrory MA. Field methods for body composition assessment are valid in healthy Chinese adults. *J Nutr.* 2002; 132: 310-317.

Recibido: 27-01-2005

Aceptado:15-06-2005

## Perfil do aleitamento materno em menores de 2 anos na cidade de Itupeva, SP, Brasil

Aurea T. Minagawa, Ida M. V. Oliveira, Elizabeth Fujimori, Daniela Laurenti, Rosali M. J. M. Montero

Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. Sao Paulo. Brasil

**RESUMO.** O objetivo deste estudo foi estimar a frequência do aleitamento materno (AM) e identificar variáveis associadas à sua duração mediana. Trata-se de um estudo transversal de base populacional realizada em amostra representativa de 261 crianças menores de 2 anos selecionadas aleatoriamente da área urbana de Itupeva, SP, Brasil. O AM foi classificado utilizando-se as recomendações da OMS. A frequência e a duração mediana foram estimadas comutalizando-se a técnica de tábuas de vida. O teste de *Wilcoxon* foi empregado para identificar associação entre as variáveis categóricas ( $p < 0.05$ ) na análise bivariada. Para análise multivariada, as variáveis associadas com a duração mediana do AM (*Teste de Wilcoxon*;  $p < 0,10$ ) foram inseridas num modelo de *Regressão de Cox*. Iniciaram a amamentação 97,3% das crianças e 41,0% ainda estavam em AM no momento da entrevista. A duração mediana do AM foi de 7,2 meses e de AM exclusivo de apenas 28 dias. Associaram-se com a mediana de aleitamento: ordem de nascimento, uso de mamadeira, uso de chupeta, número de filhos, situação conjugal da mãe e escolaridade do pai. O modelo de Regressão de Cox selecionou como significante as variáveis: ordem de nascimento (HR=1,68; IC95%=1,03-2,73), uso de mamadeira (HR=15,20; IC95%=3,69-62,01) e uso de chupeta (HR=2,84; IC95%=1,95-4,19). Pode-se concluir que o perfil do AM em Itupeva ainda se encontra distante da recomendação da OMS, necessitando da intensificação das ações de incentivo e apoio. As variáveis que influenciam o AM devem ser consideradas na operacionalização dessas ações, cabendo aos profissionais de saúde envidar todos os esforços para a aumentar a amamentação exclusiva em menores de 6 meses e prolongar o tempo total de amamentação.

**Palavras-chave:** Aleitamento materno; saúde da criança; epidemiologia

**SUMMARY. Profile of breastfeeding in children under 2 years old in the city of Itupeva, SP, Brazil.** The objective of this study was to estimate the frequency of breastfeeding and to identify variables associated with median breastfeeding length. It is a cross-sectional population-based study carried out in a representative sample of 261 children under 2 years old randomly selected in the urban area of Itupeva city, SP, Brazil. The breastfeeding patterns recommended by WHO were used. The frequency and the median length of breastfeeding were estimated by life tables technique. The Wilcoxon test was used to identify association between breastfeeding and the categorical variables ( $p < 0.05$ ) in the bivariate analysis. For the multivariate analysis, the variables associated with the breastfeeding length (Wilcoxon test;  $p < 0.10$ ) were inserted in a Cox Regression model. Almost 100% of the children have initiated breastfeeding and 41.0% were in breastfeeding at the moment of the interview. The median length of breastfeeding was 7.2 months and exclusive breastfeeding was only 28 days. It was observed association between the breastfeeding length and the following variables: father's schooling, mother's marital status, number of children, sequence of birth, bottle-feeding and pacifier use. The Cox regression model selected as significant variables: sequence of birth (HR=1.68; IC95%=1.03-2.73), bottle-feeding use (HR=15.20; IC95%=3.69-62.01) and pacifier use (HR=2.84; IC95%=1.95-4.19). The current pattern of breastfeeding in Itupeva is still far from the WHO recommendations; therefore, encouragement and support to breastfeeding need to be intensified. Variables influencing breastfeeding should be considered in the attempt to increase breastfeeding. Health workers should dedicate all their efforts to increase the exclusive breastfeeding period in children under 6 months of age and increase the total breastfeeding period.

**Key words.** Breastfeeding; child health; epidemiology

### INTRODUÇÃO

O aleitamento materno tem merecido destaque entre as ações básicas de saúde pelo papel fundamental que desempenha na redução da morbi-mortalidade e melhoria da qualidade de vida infantil, protegendo o crescimento e o desenvolvimento normal e beneficiando biológica e afetivamente a criança e sua mãe, com grande eficácia e baixo custo.

Estudo colaborativo recente, da Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca que a proteção conferida pelo leite

materno contra mortes por diarreia é mais eficiente nos primeiros seis meses de vida quando comparada à proteção contra mortes por infecções respiratórias. Os resultados dessa meta-análise, baseada em cerca de três mil investigações científicas realizadas em diversos países, inclusive o Brasil, reiteraram o efeito protetor do aleitamento materno, mostrando que crianças menores de dois anos, não amamentadas, apresentam risco seis vezes maior de morrer por doenças infecciosas quando comparadas às amamentadas (1).

Desde o final da década de 70, OMS e Unicef estabelecem

medidas para promover a saúde e nutrição da criança. No Brasil, a revisão de Rea (2) mostra a trajetória do programa nacional, com a implantação do Programa de Incentivo ao Aleitamento Materno em 1981, seguido da aprovação da Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes e da regulamentação dos Bancos de Leite Humano em 1988, além do lançamento da Iniciativa Hospital Amigo da Criança com os "Dez passos para o sucesso do aleitamento materno" em 1991.

Entre os estudos de abrangência nacional, a Pesquisa Nacional Sobre Saúde e Nutrição (PNSN) realizada em 1989, mostrou que 97% das mulheres iniciavam a amamentação, com duração mediana de 134 dias, porém com apenas 72 dias de aleitamento materno predominante (3). Comparado com os dados do Estudo Nacional de Despesa Familiar desenvolvido (ENDEF) em 1974-75, constatou-se aumento considerável no índice de amamentação, pois o tempo mediano de aleitamento materno mais do que praticamente duplicou no período, elevando-se de 2,5 para 45,5 meses (4). Dados mais recentes, embora referentes apenas às capitais dos estados, mostraram que a mediana do aleitamento materno passou para 9,9 meses em 1999, porém a mediana do aleitamento materno exclusivo mantinha-se somente em 33 dias (5).

Assim, apesar dos ganhos obtidos, ainda há necessidade de se continuar a promover a amamentação, especialmente a prática do aleitamento materno exclusivo até os seis meses, que permanece bastante inferior às recomendações da OMS (6), da mesma forma que a manutenção do aleitamento materno, acrescido de alimentos complementares, até os dois anos de idade ou mais.

O tempo mediano, tanto do aleitamento materno geral quanto do exclusivo, tem sido associado a uma série de variáveis, tais como idade, situação conjugal e trabalho materno, escolaridade da mãe e do pai, paridade, tipo de parto, experiência prévia, peso ao nascer, momento da primeira mamada, uso de mamadeira e chupeta, entre outros, revelando a interação de determinantes sociais, econômicos, políticos, culturais e psicológicos (7-9).

Considerando que a determinação de tais variáveis poderia contribuir para uma maior efetividade prática dos programas de promoção do aleitamento materno, com o controle e/ou modificação dos fatores suscetíveis de intervenção, desenvolveu-se este estudo que teve como objetivo analisar o perfil do aleitamento materno em crianças menores de 2 anos, identificando variáveis a ela associadas. Tendo em vista que o desmame precoce ainda representa um problema de saúde coletiva, que se associa diretamente à morbi-mortalidade infantil, e que estudos de abrangência populacional e de caráter local (o conhecimento dos determinantes daquela comunidade) são de suma importância para o direcionamento das políticas públicas locais de saúde e de incentivo ao aleitamento materno,

justifica-se a realização deste estudo, que teve como objetivo estimar a frequência e identificar variáveis associadas à duração mediana do aleitamento materno.

## MÉTODOS

Este estudo transversal, de base populacional, integra um projeto mais amplo desenvolvido em Itupeva, SP, município localizado 70 km a oeste da cidade de São Paulo. A amostra do projeto maior foi delineada para ser representativa e proporcional ao número de crianças com idade inferior a 2 anos, residentes nos setores censitários que compunham a zona urbana do município. Para garantir a representatividade da amostra para os diversos sub-projetos, além da estimativa do número de crianças menores de dois anos e do número de domicílios na área urbana do município, considerou-se também uma prevalência estimada de 45% de anemia.

Utilizando-se o procedimento de amostragem por conglomerados, e com base na teoria da Inferência Estatística, obteve-se um tamanho amostral de 274 crianças, aceitando-se um erro de até 5,0%, com previsão de 10% de perdas e recusas. O sorteio foi realizado em três etapas, obedecendo-se ao critério de probabilidade. Sortearam-se inicialmente os setores censitários urbanos e as áreas urbanas isoladas (ou núcleos urbanos da zona rural), seguido dos conglomerados de domicílios (quadras ou quarteirões), e finalmente os domicílios individuais. A amostra final foi constituída por 261 crianças.

A pesquisa foi aprovada por Comitê de Ética em Pesquisa registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e os dados foram obtidos a partir de um inquérito domiciliar, realizado nos meses de julho e agosto de 2001, por equipe treinada. A entrevista foi realizada somente com a mãe da criança, utilizando-se um formulário com questões objetivas e respostas fechadas.

Considerou-se como variável dependente, a frequência e a duração do aleitamento materno, classificado de acordo com os indicadores recomendados pela OPS/OMS (10):

*Aleitamento materno (AM)*: alimentação com leite materno, independente do consumo de qualquer complemento, lácteo ou não.

*Aleitamento materno exclusivo (AME)*: alimentação exclusiva com leite materno, sem qualquer outro líquido ou sólido, porém podendo receber vitaminas, minerais ou medicamentos.

*Aleitamento materno predominante (AMP)*: alimentação em que o leite materno constituiu a principal fonte de alimentação, porém inclui água, chás, suco de frutas, soro de rehidratação oral, porém nenhum outro leite ou alimento semi-sólido.

*Aleitamento materno complementado em tempo oportuno*: alimentação com leite materno e alimentos sólidos ou semi-

sólidos, independente de receber outro leite ou outros líquidos.

*Aleitamento materno contínuo 1:* lactentes de 12 a 15 meses que continuam recebendo leite materno.

*Aleitamento materno contínuo 2:* lactentes de 20 a 23 meses que continuam recebendo leite materno.

Como variáveis independentes, foram estudadas características familiares (renda familiar per capita e escolaridade do pai); características maternas (idade, escolaridade, inserção no trabalho, situação conjugal, número de filhos, orientações sobre AM no pré-natal e no parto); e características infantis (idade, sexo, peso ao nascer, tempo e ordem de nascimento, uso de mamadeira e de chupeta).

Os dados obtidos foram inseridos em bancos de dados criados no programa Excel. A análise foi feita utilizando-se os pacotes estatísticos EpiInfo 6, Statistical Package for Social Science - SPSS 8.0 e Stata.

Para se obter as estimativas do AM atual (no momento da entrevista) e respectivos intervalos de 95% de confiança, considerou-se o setor censitário como unidade primária de amostragem.

Obteve-se o tempo mediano de AM utilizando-se a técnica de tábuas de vida, considerando-se como evento final a interrupção definitiva da amamentação. Em relação à criança que ainda recebia leite materno, o tempo de AM referiu-se à própria idade da criança. O uso dessa técnica permitiu utilizar informações tanto de crianças desmamadas como daquelas amamentadas no momento da entrevista, favorecendo uma análise longitudinal dos dados, mesmo tendo sido o estudo delineado como transversal. No caso do AME e do AMP, foram considerados como evento final a introdução de água, chás ou sucos e a introdução de qualquer outro alimento, respectivamente. As crianças que nunca haviam recebido leite materno foram consideradas como se tivessem iniciado a amamentação e parado logo depois (tempo de AM = 0).

A associação entre a variável dependente, expressa em curvas de sobrevida do AM, e as variáveis independentes foi inicialmente avaliada através do teste de *Wilcoxon*, adotando-se um nível de significância de 5%. Na análise multivariada, as variáveis que apresentaram associação com o tempo de AM, no nível de significância de 10% ( $P < 0,10$ ), foram analisadas adotando-se o modelo de *Regressão de Cox*, com processo de seleção de variáveis "backward", utilizando-se como variável dependente o tempo de AM. Os resultados foram expressos em *hazard ratio* - HR (razão de densidade de incidências), com intervalo de 95% confiança (IC).

## RESULTADOS

Do total das crianças estudadas, apenas sete não iniciaram a amamentação, ou seja, 97,3% haviam sido ou estavam sendo amamentadas. A Tabela 1 apresenta os indicadores do AM no momento da entrevista, de acordo com a classificação da OMS.

Observa-se que mais da metade das 261 crianças estudadas já haviam sido desmamadas, uma vez que somente 41% estavam em AM (IC95%: 35,0 – 47,0). Entre os menores de 4 meses, 77,8% recebiam leite materno (IC95%: 65,2 – 90,4), porém apenas 17,8% estavam em AME (IC95%: 6,7 – 29,4) e 31,1% já estavam em AMP (IC95%: 17,0 – 45,0). Cerca de um quarto dos menores de 6 meses já não recebiam mais leite materno.

TABELA 1

Indicadores da situação do Aleitamento Materno (AM) atual, no momento da entrevista. Itupeva, São Paulo, 2001

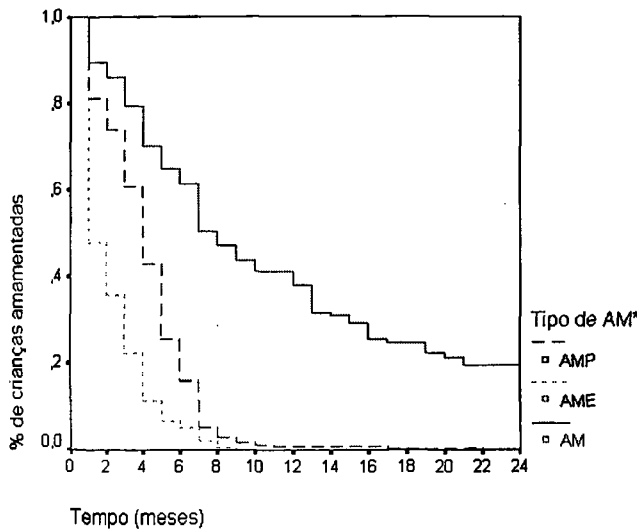
Tipo de aleitamento materno (AM)	Faixa etária (meses)	Total de crianças	Crianças amamentadas n	IC (95%) (%)
AM – Aleitamento materno	0 – 24	261	107 (41,0)	35,0 - 47,0
	< 4	45	35 (77,8)	65,2 - 90,4
	< 6	71	51 (71,8)	61,1 - 82,5
AME - AM Exclusivo	< 4	45	8 (17,8)	6,7 - 29,4
	< 6	71	9 (12,7)	4,7 - 20,6
AMP - AM Predominante	< 4	45	14 (31,1)	17,0 - 45,0
	< 6	71	14 (19,7)	10,0 - 29,0
AM Complementado em tempo oportuno	6 – 9	47	7 (14,9)	4,3 - 25,5
AM Contínuo 1	12 – 15	42	7 (15,2)	4,9 - 28,4
AM Contínuo 2	20 – 24	38	12 (31,6)	16,1 - 47,1

A Figura 1, construída a partir da técnica de tábuas de vida apresenta o padrão de AM, AME e AMP no decorrer dos primeiros dois anos de vida. A probabilidade de amamentação no final do primeiro mês era de 89,6%, caindo para 70,0% e 61,5% aos quatro e seis meses, respectivamente. A curva apresenta declínio mais acentuado nos primeiros seis a sete meses, revelando o quão elevada é a taxa de desmame nesse período. Aos 12 meses, a probabilidade das crianças continuarem sendo amamentadas era de apenas 38,1%, e de 24,6% aos 18 meses. A curva de sobrevida revela também que aos 24 meses, a proporção de crianças que continuariam em AM seria de apenas 19,5%. A duração mediana do AM (idade em que a metade das crianças ainda é amamentada) para todas as crianças estudadas foi de 7,2 meses. As curvas de AMP e AME revelaram que ao final do primeiro mês, apenas 47,7% das crianças encontravam-se em AME, proporção que cai para 35,6% aos dois meses e 11,3% aos quatro meses. A mediana do AME foi de apenas 0,9 meses

(28 dias). A probabilidade da criança estar em AMP, ou seja, receber água, outros líquidos ou alimentos, no primeiro mês de vida era de 18,8%, passando para 60,9% no terceiro mês de vida.

FIGURA 1

Duração estimada do aleitamento materno (AM), aleitamento materno exclusivo (AME) e aleitamento materno predominante (AMP) mediante o uso de curvas de sobrevida. Itupeva, São Paulo, 2001



A associação entre a duração do AM e as variáveis estudadas está apresentada na Tabela 2. A duração do AM associou-se inversamente com a escolaridade do pai, de forma que crianças de pais com menor escolaridade ( $\leq 3$  anos de estudo) mamavam por tempo significativamente maior comparada às crianças de pais com maior escolaridade. Também a situação conjugal da mãe influenciou no tempo de AM, pois aquelas que viviam com o companheiro amamentavam significativamente mais tempo. Em relação ao número de filhos e ordem de nascimento, verificou-se que a duração do AM das mulheres com um filho era menor em relação às aquelas com três ou mais filhos e que os primeiros filhos eram amamentados por menos tempo em comparação aos filhos de terceira ordem em diante. A duração mediana do AM foi significativamente maior entre as crianças que não faziam uso da mamadeira, da mesma forma que entre aquelas que não faziam uso da chupeta (havendo uma diferença de mais de dez meses na mediana de duração do AM).

TABELA 2  
Variáveis estudadas e associação com o tempo de Aleitamento materno (AM). Itupeva, São Paulo, 2001

Variáveis	n	Mediana de AM (meses)	p*
<b>Características familiares</b>			
Renda familiar <i>per capita</i>			0,1910
≥ 1,8 salário-mínimo	215	7,8	
<1,8 salário-mínimo	46	6,8	
Escolaridade do pai (anos)			0,0009
< 3	16	24,0	
>3	201	7,6	
<b>Características maternas</b>			
Idade (anos)			0,9075
<20	40	10,8	
≥20	221	7,5	
Escolaridade (anos)			0,8887
< 3	27	12,6	
>3	233	7,5	
Inserção no trabalho			0,0655
Sim	74	6,1	
Não	187	7,9	
Situação conjugal			0,0334
Com companheiro	227	8,0	
Sem companheiro	34	4,5	
Número de filhos			0,0223
Um	99	6,1	
Dois	89	7,9	
Três ou mais	73	9,5	
Orientações sobre AM no pré-natal			0,6172
Sim	131	7,3	
Não	130	7,8	
Orientações sobre AM no parto			0,1022
Sim	226	7,6	
Não	35	7,0	
<b>Características infantis</b>			
Sexo			0,4854
Masculino	141	6,9	
Feminino	120	7,8	
Peso ao nascer			0,7238
<2500g	18	7,3	
≥2500g	241	7,6	
Nascimento de termo			0,6096
Sim	239	7,6	
Não	22	7,1	
Ordem de nascimento			0,0107
1º filho	99	6,1	
2º filho	91	8,3	
3º filho em diante	71	10,2	
Uso de mamadeira			<0,001
Sim	216	6,6	
Não	45	24,0	
Uso de chupeta			<0,001
Sim	139	4,6	
Não	122	14,9	

\* Teste de Wilcoxon

A Tabela 3 mostra o resultado estatístico da análise multivariada. O modelo de Regressão de Cox selecionou como significativas apenas as variáveis ordem de nascimento, uso de mamadeira e uso de chupeta. Observa-se que as crianças de primeira ordem apresentaram chance 1,68 vezes maior de terminar o segundo ano de vida desmamadas, em relação àquelas de terceira ordem. Essa chance foi 2,84 vezes maior para as crianças que faziam uso de chupeta e 15,2 vezes maior para aquelas que faziam uso de mamadeira, comparadas àquelas que não faziam uso de chupeta e mamadeira, respectivamente.

TABELA 3

Valores do Hazard Ratio, intervalo de confiança (IC) e significância estatística (p) obtidos no modelo de Cox para as variáveis finais selecionadas, tendo o desmame aos 24 meses como variável dependente. Itupeva, São Paulo, 2001

Variáveis	Hazard ratio	(IC 95%)	p
Ordem de nascimento			
1°	1,68	(1,03-2,73)	0,04
2°	0,98	(0,61-1,56)	0,93
3° em diante	1	—	—
Uso de chupeta			
Sim	2,84	(1,95-4,19)	<0,001
Não	1	—	—
Uso de mamadeira			
Sim	15,20	(3,69-62,01)	<0,001
Não	1	—	—

## DISCUSSÃO

Como parte de uma investigação mais ampla que teve como finalidade caracterizar os determinantes das condições de saúde e nutrição da população menor de dois anos da cidade de Itupeva, este estudo avalia o perfil do AM a partir de inquérito domiciliar. Apesar da amostra ter sido calculada para uma prevalência esperada de 45% de anemia, a prevalência de AM encontrada, 41% (IC95%: 35,0-47,0) com um erro de 6%, mostra que o cálculo amostral também foi válido para estudar o AM.

Em estudos de natureza transversal, os dados sobre o AM podem ser obtidos a partir de recordatório de 24h, isto é, da frequência de crianças amamentadas no dia anterior ao da entrevista (*current status*) ou a partir de dados colhidos de forma retrospectiva, como no presente estudo. Neste caso, a análise dos dados com o emprego da técnica de tábuas de vida, permite obter uma estimativa longitudinal do aleitamento, possibilitando estudar a prevalência desse evento e a incidência do desmame, com número menor de observações. Apesar disso, a análise dos resultados encontrados deve considerar o viés de

memória, comum nos estudos que obtêm informações retrospectivas (11). Entretanto, mesmo não se obtendo o consumo alimentar da criança nas 24 horas anteriores à da entrevista, a mãe foi questionada sobre o estado atual da amamentação e a idade de introdução de determinados alimentos, possibilitando assim a construção da Tabela 1, similar à de estudos que utilizam o método *current status*, podendo-se fazer algumas analogias.

Tendo em vista essas considerações é que se analisam e discutem os parâmetros do AM ora estudados, isto é, a proporção de crianças amamentadas e o tempo em que elas permaneceram em AM (duração mediana), além da associação entre a duração mediana do AM e variáveis familiares, maternas e infantis, traçando-se alguns paralelos com perfis já determinados em outras localidades do Brasil.

Os resultados obtidos revelaram que quase a totalidade das crianças iniciou o aleitamento materno em Itupeva (97,3%). Essa proporção é similar àquela encontrada no Brasil em 1989 (97,0%) pela Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (3).

Apesar disso, a situação do AM na área urbana de Itupeva é preocupante, pois nos meses seguintes, a proporção de crianças amamentadas diminuiu rapidamente, caracterizando um quadro de desmame precoce está muito aquém das recomendações da OMS (1991). No momento da entrevista, embora quase a totalidade das mães iniciasse a amamentação, menos da metade das crianças estavam sendo amamentadas (41,0%) no momento da entrevista, apesar do AM ser recomendado até os dois anos de vida ou mais. Em relação. Entre os menores de 4 e 6 meses, a proporção de crianças em AM era de 77,8% e 71,8%, enquanto encontravam-se em AME, somente 17,8% e 12,7%, respectivamente exclusivo.

Esses resultados encontram-se bastante aquém daqueles relatados para os menores de 4 meses do Distrito Federal (12), 85,3% e 26,8% de crianças em AM e AME, respectivamente, porém similar aos verificados para os menores de 6 meses, 70,9% e 12,8%. Já em relação a São Carlos (13), observou-se dados similares quanto ao AM aos 4 e 6 meses (73,3 com apenas 1,8% das crianças de 6 meses encontravam-se em AME e % e 63,8%, respectivamente), enquanto o AME foi maior tanto entre os menores de 4, quanto entre os menores de 6 meses (37,8 e 27,7%, respectivamente) em AME aos 3 meses de idade.

A duração mediana do AM em Itupeva foi de apenas 7,2 meses, tempo inferior à mediana brasileira de aos 9,9 meses constatados pelo Ministério da Saúde nas capitais brasileiras, no último estudo de maior abrangência (5), contudo superior aos 6,6 meses em Ouro Preto (14) e na região Nordeste do Brasil (7).

Em relação ao AME, a duração mediana de encontrada (28 dias) reitera os preocupantes 33 dias relatados encontrados

para o Brasil (5) e 39,4 dias no Distrito Federal (12). Além disso, ao final do primeiro mês somente 47,7% das crianças encontravam-se em AME, proporção que aos quatro meses caiu para 11,3%. Esses dados indicam que a situação do AME é crítica, tanto em Itupeva quanto em outras localidades do Brasil.

Audi et al (8) verificaram que quase um quarto das crianças com menos de 90 dias recebiam água ou chá no Município de Itapira. César et al (15), entrevistando todos os médicos que prestavam atendimento a crianças em Pelotas, encontraram cerca de metade recomendando o uso de chás para crianças menores de seis meses, para o tratamento de cólicas, ainda que não haja evidências científicas que comprovando esse efeito benéfico. Esses comportamentos se refletem na extensão do AMP no encontrado no presente estudo, que apresentou uma mediana mais próxima de 4 meses que o aleitamento materno exclusivo.

Algumas variáveis que têm sido classicamente relacionadas ao tempo de AM - renda familiar, idade, escolaridade e trabalho maternos, orientações sobre AM, baixo peso ao nascer e nascimento pré-termo - não interferiram na prática da amamentação em Itupeva.

A mediana de AM foi quase a metade quando a mãe não vivia com companheiro, denotando que a presença do pai é importante e se associa com maior duração do AM. Issler et al (16) constataram que o apoio do pai é fundamental na decisão de amamentar e também na duração do AM, destacando a importância de considerar o pai nos programas de incentivo ao AM.

A associação entre menor escolaridade paterna e maior duração do AM contraria a tendência secular dos padrões de AM evidenciada pela OMS (17) e constatada no Município de São Paulo (9). De acordo com essa análise, a tendência observada é que após um período de baixa prevalência e duração, a retomada do AM tem início nas classes mais privilegiadas (com mais informação e acesso aos serviços de proteção e apoio ao AM) que posteriormente influencia o comportamento das classes mais pobres. Nos anos de 1973/74, verificou-se que menor número de mulheres das classes de renda mais elevada amamentavam no Município de São Paulo (18). Já na década seguinte, nos anos de 1984/85, Monteiro et al (9) confirmaram a tendência observada pela OMS (17), uma vez que encontraram associação positiva entre duração mediana da amamentação e escolaridade do chefe da família.

Em relação ao número de filhos e ordem de nascimento, as primíparas amamentaram por menos tempo, da mesma forma que o observado por Issler et al (16) e Gigante et al (19). O Issler et al (16) lembram que a "primigesta não tem nenhuma experiência orgânica ou emocional anterior", fato reiterado neste estudo, uma vez que crianças de terceira ordem em diante foram amamentadas por mais tempo. Por sua vez,

O estudo prospectivo de Ingran et al, Woolridge e Greenwood (20), que analisaram a quantidade de leite produzido, constataram realmente que as primíparas produziam significativamente menos leite que as múltiparas.

A OPS/OMS (10) recomenda estudar a frequência da alimentação do lactente com mamadeira, pois essa prática prejudica o AM, diminuindo a sucção e conseqüentemente a produção do leite, que favorece o desmame e aumenta a taxa de morbidade e mortalidade por diarreia. Em Itupeva, comprovou-se que a mediana de AM decresceu 17,4 meses com o uso da mamadeira, diferença superior àquela verificada na Região Nordeste do Brasil, que foi de 13,9 meses em 1996 (7).

Quanto ao uso da chupeta e sua relação com o AM, muito se tem estudado, especialmente depois que Victora et al (21) demonstraram maior risco de desmame entre usuárias de chupetas. Embora a chupeta não tenha sido constatada como causa, representa uma ferramenta importante para o desmame, uma vez que mães "menos à vontade para amamentar" sofrem mais interferência da chupeta do que aquelas mais seguras em relação à amamentação. Assim, apesar da não causalidade, Victora et al (22) sugerem que a chupeta seja utilizada como um marcador para identificar crianças e mães com dificuldade para amamentar. Diferentemente desses resultados, Aarts et al (23) constataram que o uso da chupeta diminuiu a duração do AM, mesmo em mães motivadas para amamentar e com experiência prévia. Para Howard et al (24) e Marques et al (25), o fato da chupeta aumentar o intervalo das mamadas e diminuir o estímulo para a produção do leite explica em parte a associação confirmada entre o uso dessa ferramenta e a menor duração do AM.

Dados do Ministério da Saúde revelam que 53% das crianças menores de 1 ano usam chupeta no Brasil (5). Victora et al (22), em estudo epidemiológico e etnográfico que envolveu visita em 650 domicílios de mães e bebês no Sul do Brasil, constataram que com 1 mês, 85% dos bebês usavam chupeta. Mesmo em população orientada para evitar seu uso, constatou-se que 61,6% a utilizavam no final do primeiro mês de vida (26). Assim, para Lamounier (27), apesar da relação bem estabelecida entre uso de chupeta e menor duração do aleitamento materno, tal associação necessita ser mais estudada e explicada, principalmente porque esses hábitos são muito difundidos e culturalmente arraigados no Brasil e em outros países.

Cabe ressaltar que os resultados do presente estudo não possibilitaram definir relação de causa e efeito, uma vez que a exposição e o desfecho foram avaliados ao mesmo tempo. O que se constatou foi menor duração de AM entre crianças que utilizavam mamadeira e chupeta no momento da entrevista. Além disso, apesar de representativo da população de crianças menores de dois anos, a amostra estudada pode ter sido reduzida a ponto de não indicar associações do AM

com variáveis importantes, reconhecidamente associadas com essa prática. Mesmo assim, os resultados permitem estabelecer algumas conclusões e recomendações.

Em primeiro lugar, a sinalização de que o maior problema encontrado em Itupeva refere-se ao tempo extremamente curto de AME, indicando que a introdução de outros alimentos é precoce. Em segundo lugar, a constatação de Constatou-se que diversas variáveis associaram-se estatisticamente com o tempo de AM, reiterando-se : ordem de nascimento, orientação sobre AM no local do parto, número de filhos, situação conjugal materna, trabalho regular materno e escolaridade paterna, além de uso de mamadeira e uso de chupeta. Assim, reitera-se o conceito estabelecido de que o declínio ou o aumento do AM é determinado por uma multiplicidade de variáveis complexas e inter-relacionadas que devem ser consideradas na identificação de prioridades para o planejamento de intervenções de apoio ao AM.

No caso de Itupeva SP, os resultados apontam que as primigestas e aquelas que vivem sem companheiro devem ser priorizadas nas intervenções, e que o uso de mamadeiras e chupetas deve ser desestimulado. Além disso, os dados do presente estudo reforçam revelam a necessidade de se melhorar a qualidade do pré-natal e do atendimento ao parto implementar ações de promoção, proteção e apoio ao AM, cabendo aos profissionais de saúde envidar todos os esforços nos serviços de saúde do município, com vistas a aumentar a amamentação exclusiva em crianças menores de 6 meses e prolongar o tempo total de amamentação. Destaca-se que a educação das gestantes e puérperas é fundamental para a promoção do AM, porém mais importante é a educação dos profissionais de saúde, que devem ter conhecimento sobre o assunto e manter atitudes positivas em relação ao AM (39). Além da orientação no pré-natal e pós-parto imediato, Albernaz e Vitoria (40) ressaltam a importância do apoio às mães após a alta hospitalar, com a inclusão de orientações relacionadas à técnica de aleitamento e resolução de problemas que a mãe venha a encontrar concretamente durante a amamentação.

Reforça-se, pois, a necessidade de se implementar ações de promoção, proteção e apoio ao AM, com mobilização de toda a equipe de saúde e adoção de medidas simples, que vêm se mostrando essenciais para melhorar os padrões de AM.

#### AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a colaboração prestada por diversas pessoas e instituições sem cujo apoio a coleta dos dados e o desenvolvimento deste estudo não seria possível. De forma especial, expressamos nossos agradecimentos:

às mães e crianças que aceitaram participar do estudo à Prefeitura Municipal de Itupeva: Sr. Dorival Raimundo, Prefeito Municipal; Sr. Antonio Sergio Pereira, Diretor de Saúde; Sr. Antonio Gropelo, Diretor de Planejamento; Sr

Benedito e motoristas, especialmente Sr. Pedrinho à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pelas bolsas concedidas à Maria Mercedes Loureiro Escuder pelo auxílio estatístico e pelas sugestões à Francine Fernandes Pires e Carolina Anunciação Ramos pela colaboração na coleta dos dados

#### REFERÊNCIAS

1. Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. *Lancet* 2000; 355: 451-5.
2. Rea MF. Reflexões sobre a amamentação no Brasil: de como passamos a 10 meses de duração. *Cad Saúde Públ* 2003;19(Supl.1): S37-S45.
3. Leão, M. M. Coitinho DC, Recine E, Costa LAL, Lacerda AJ. O perfil do aleitamento materno no Brasil. In: Fundação IBGE. Perfil estatístico de crianças e mães no Brasil - 1989. Rio de Janeiro, 1992. p:97-109.
4. Venâncio SI, Monteiro CA. A evolução da prática do AM no Brasil nas décadas de 70 e 80. *Rev Bras Epidemiol* 1998;1(1): 40-9.
5. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Área de Saúde da Criança. Prevalência do AM nas capitais brasileiras e no Distrito Federal. Brasília, DF; 2001.
6. World Health Organization. The optimal duration of exclusive breastfeeding. [online] Note for press n°7, 2001. Disponível em: [<http://www.who.int/inf-pr-2001/en/note2001-07.html>].
7. Lima TM, Osório MM. Perfil e fatores associados ao AM em crianças menores de 25 meses da Região Nordeste do Brasil. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2003;3(3):305-14.
8. Audi CAF, Corrêa AMS, Latorre MRDO. Alimentos complementares e fatores associados ao AM exclusiva em lactentes até 12 meses de vida em Itapira, São Paulo, 1999. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2003;3(1):85-93.
9. Monteiro CA, Zuñiga HPP, Benício MHD'A, Rea MF. Breast-feeding patterns and socioeconomic status in the city of São Paulo. *J Trop Pediatr* 1988;34:186-92.
10. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Indicadores para evaluar las prácticas de lactancia materna. Ginebra: OMS/CED/SER/91. 14, 1991.
11. Notzon F. Trends in infant feeding in developing countries. *Pediatrics* 1984;74 (suppl.):648-66.
12. Sena MCF, Silva EF, Pereira MG. Prevalência do aleitamento materno no Distrito Federal, Brasil. *Cad Saúde Públ* 2002, 18(3):613-21.
13. Montrone VG, Arantes CI. Prevalência do aleitamento materno na cidade de São Carlos, São Paulo. *J Pediatr (Brasil)* 2000;76(2):138-42.
14. Passos MC, Lamounier JA, Silva CAM, Freitas SN, Baudson MFR. Práticas de amamentação no município de Ouro Preto, MG, Brasil. *Rev Saúde Públ* 2000;34(6):617-22.
15. César JA, Kuhn D, Devens ES, Martins E, Aguiar, MRC, Holthausen RS, Teixeira AMB, Horta BL. Prescrição de chás para crianças menores de seis meses: a opinião dos médicos de

- uma cidade de porte médio do sul do Brasil. *J Pediatr (Brasil)* 1996;72(1):27-31.
16. Issler H, Leone C, Quintal VS. Duração do aleitamento materno em uma área urbana de São Paulo, Brasil. *Bol Of Sanit Panam* 1989;106(6):513-22.
  17. World Health Organization. The prevalence and duration of breast-feeding: a critical review of available information. *World Health Stat. Q* 1982;35:92-116.
  18. Sigulem DM, Tudisco ES. Aleitamento natural em diferentes classes de renda no município de São Paulo. *Arch Latinoam Nutr* 1980;30(3):400-16.
  19. Gigante DP, Victora CG, Barros FC. Nutrição materna e duração da amamentação em uma coorte de nascimentos de Pelotas, RS. *Rev Saúde Públ* 2000;34(3):259-65.
  20. Ingram J, Woolrdge M, Greenwood R. Breastfeeding: it is worth trying with the second baby. *Lancet* 2001;358:986-87.
  21. Victora CG, Tomasi E, Olinto MTA, Barros FC. Use of pacifier and breastfeeding duration. *Lancet* 1993;341:404-6.
  22. Victora CG, Behague DP, Barros FC, Olinto MTA, Weiderpass E. Pacifier use and short breastfeeding duration: cause, consequence, or coincidence? *Pediatrics* 1997;99(3):445-53.
  23. Aarts A, Hörnell A, Kylberg E, Hofvander Y, Gebre-Medhin M. Breastfeeding patterns in relation to thumb sucking and pacifier use. *Pediatrics* 1999;104(4):50-60.
  24. Howard CR, Howard FM, Lanphear B, deBlicke EA, Eberly S, Lawrence RA. The effects os early pacifier use on breatfeeding duration. *Pediatrics* 1999,103(3):33-8.
  25. Marques SM, Lira PIC, Lima MC, Silva NL, Batista Filho M, Huttly SRA, Ashworth \* Breastfeeding and early weaning practices in Northeast Brazil: a longitudinal Study. *Pediatrics* 2001,108(4):66-72.
  26. Soares MEM, Giugliani ERJ, Braun ML, Salgado ACN, Oliveira AP, Aguiar PR. Uso de chupeta e sua relação com o desmame precoce em população de crianças nascidas em Hospital Amigo da Criança. *J Pediatr (Brasil)* 2003;79(4):309-16.
  27. Lamounier JA. O efeito de bicos e chupetas no aleitamento materno. *J Pediatr (Brasil)* 2003;79(4):284-6.
  28. Giugliani ERJ. Amamentação: como e porque promover. *J Pediatr (Brasil)* 1994;70(3):138-51.
  29. Albernaz E, Victora CG. Impacto do aconselhamento face a face sobre a duração do aleitamento exclusivo: um estudo de revisão. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 14(1): 17-24.

Recibido: 28-01-2005

Aceptado: 27-07-2005

## Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de niveles de vitamina A en leche materna. Su aplicación a una población rural de Argentina

Laura B. López, Andrea V. Baroni, Viviana G. Rodríguez, Carola B. Greco, Sara Macías de Costa, Silvia Rodríguez de Pece y Patricia Ronayne de Ferrer

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Centro de Investigaciones Apícolas (CEDIA).  
Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina

**RESUMEN.** Se desarrolló y validó una metodología para la cuantificación de vitamina A en leche humana. Se determinaron los niveles en 223 muestras correspondientes a los meses 5, 6 y 7 posparto, obtenidas en la provincia de Santiago del Estero. Las muestras (500 µL) se saponificaron con hidróxido de potasio/ etanol, se extrajeron con hexano, se llevaron a sequedad y se reconstituyeron con metanol. Se utilizó una columna RP-C18, fase móvil metanol /agua (91:9 v/v) y detector de fluorescencia ( $\lambda$  excitación 330 nm y  $\lambda$  emisión 470 nm) para la separación y cuantificación de vitamina A. Los parámetros analíticos de linealidad ( $r^2$ : 0,9995), límites de detección (0,010 µg/mL) y de cuantificación (0,025 µg/mL), precisión del método (desvío estándar relativo, RSD = 9,0% en el día y RSD = 8,9% entre días) y exactitud (recuperación = 83,8%) demuestran que el método desarrollado permite cuantificar la vitamina A en forma eficiente. Los valores promedios  $\pm$  desvío estándar (DE) obtenidos en las muestras analizadas fueron  $0,60 \pm 0,32$ ;  $0,65 \pm 0,33$  y  $0,61 \pm 0,26$  µg/mL para 5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> mes, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en los tres meses analizados y los valores hallados fueron similares a los de bibliografía. El 19,3% del total de la población estudiada presentó niveles inferiores a 0,40 µg/mL, lo que supone un riesgo para los niños de ese grupo, ya que son necesarios al menos 0,50 µg/mL para cubrir los requerimientos diarios del bebé.

**Palabras clave:** HPLC, validación, retinol, leche materna.

**SUMMARY.** Development and validation of an HPLC method for the quantification of vitamin A in human milk. Its application to a rural population in Argentina. A methodology for the quantification of vitamin A in human milk was developed and validated. Vitamin A levels were assessed in 223 samples corresponding to the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> postpartum months, obtained in the province of Santiago del Estero, Argentina. The samples (500 µL) were saponified with potassium hydroxide/ ethanol, extracted with hexane, evaporated to dryness and reconstituted with methanol. A column RP-C18, a mobile phase methanol /water (91:9 v/v) and a fluorescence detector ( $\lambda$  excitation 330 nm and  $\lambda$  emission 470 nm) were used for the separation and quantification of vitamin A. The analytical parameters of linearity ( $r^2$ : 0.9995), detection (0.010 µg/mL) and quantification (0.025 µg/mL) limits, precision of the method (relative standard deviation, RSD = 9.0% within a day and RSD = 8.9% among days) and accuracy (recovery = 83.8%) demonstrate that the developed method allows the quantification of vitamin A in an efficient way. The mean values  $\pm$  standard deviation (SD) obtained for the analyzed samples were  $0.60 \pm 0.32$ ;  $0.65 \pm 0.33$  and  $0.61 \pm 0.26$  µg/mL for the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> postpartum months, respectively. There were no significant differences among the three months studied and the values found were similar to those in the literature. Considering the whole population under study, 19.3% showed vitamin A levels less than 0.40 µg/mL, which represents a risk to the children in this group since at least 0.50 µg/mL are necessary to meet the infant daily needs.

**Key words:** HPLC, validation-retinol, human milk.

### INTRODUCCION

La lactancia es la alimentación óptima del neonato, pero han surgido interrogantes sobre posibles cambios en los niveles de algunos nutrientes, debido a la dieta. Es sabido que mujeres deficientes en vitamina A presentan bajos niveles de retinol lácteo. Esta situación incidiría negativamente en el estado nutricional del lactante con respecto a esta vitamina y podría relacionarse con una mayor morbi-mortalidad. De acuerdo

con los datos hallados en bibliografía las poblaciones con suficiente vitamina A alcanzan concentraciones en la leche entre 0,50 y 0,70 µg/mL (1). Se considera que concentraciones por debajo de 0,40 µg/mL son típicas de poblaciones deficientes (2-4).

Hasta el momento, la única forma de evaluar si la cantidad de vitamina A que los niños ingieren es la adecuada, es a través de la cuantificación de dicho nutriente en la leche materna, ya que no existe una buena correlación entre los niveles de

vitamina A en suero materno y los niveles lácteos (5).

Para la cuantificación de retinol en muestras de leche y fórmulas infantiles a base de leche es necesario realizar una saponificación de la muestra, una extracción de dicha vitamina con un solvente orgánico y un análisis posterior por HPLC utilizando un detector UV/visible (6-9). Sin embargo, cuando la muestra a analizar es leche materna, en general se dispone de un pequeño volumen de muestra. Esto hace necesario contar con una técnica muy sensible. Es por este motivo que en el presente trabajo se desarrolló y validó un método para la determinación de vitamina A en leche materna adaptando la técnica de saponificación y extracción a una pequeña cantidad de muestra (500  $\mu$ L) y realizando la detección por fluorescencia ya que permite obtener una sensibilidad mucho mayor.

Con esta metodología se analizaron muestras de leche materna correspondientes a los meses 5, 6 y 7 posparto de madres de niños nacidos a término de una población rural de bajos recursos de Argentina, con el objetivo de conocer los niveles de vitamina A láctea de este grupo poblacional.

## MATERIALES Y METODOS

### Aparatos

El sistema utilizado consistió en una bomba 515 HPLC Pump (Waters) con inyector Rheodyne (loop de 50  $\mu$ L), un detector de fluorescencia (474 Scanning Fluorescence Detector, Waters) y una columna ET 250/8/4 Nucleosil® 10 C<sub>18</sub> (Macherey Nagel). Se utilizó como fase móvil metanol:agua (91:9, v/v) con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a  $\lambda$  excitación 330 nm y  $\lambda$  emisión 470 nm. La adquisición de datos se realizó con el programa Chromatography Station CSW de DataApex Ltd. Se trabajó con solventes de calidad HPLC (J.T. Baker) y agua ultrapura (EASYPure RF, Barnstead).

### Muestras

En primera instancia, se trabajó con muestras provenientes de mujeres sanas de clase media con niveles normales de vitamina A, tomadas alrededor del 1er mes posparto, para realizar los ensayos de validación.

Posteriormente, se analizaron 223 muestras de leche materna, correspondientes a madres de niños nacidos a término y que asistían al Hospital Distrital de Forres, Santiago del Estero, Argentina, para sus visitas periódicas de control. En todos los casos se les solicitó su consentimiento para la realización del presente estudio. Las muestras correspondieron a los meses 5 (n= 75), 6 (n= 80) y 7 (n= 68) posparto.

Las muestras de leche se obtuvieron por extracción manual de un seno, vaciándolo completamente. La leche se colocó en frascos de plástico y se conservó a -20°C y al abrigo de la luz hasta su procesamiento. Todas las recolecciones se efectuaron entre las 10 y 12 horas.

### Preparación del estándar

Se preparó una solución madre de retinol disolviendo una alícuota de todo- trans retinol (Sigma – Aldrich) en metanol calidad HPLC (J. T. Baker). Se realizaron diluciones con el mismo solvente hasta obtener valores de absorbancia entre 0,3 y 0,5 a 325 nm. Se calculó la concentración de esta solución utilizando la Ley de Lambert - Beer y se diluyó, aproximadamente a 0,5  $\mu$ g/mL, para realizar la inyección cromatográfica.

### Preparación de las muestras

#### Saponificación

Se colocaron exactamente 500  $\mu$ L de leche materna en erlenmeyer color caramelo, se agregaron 2 g de hidróxido de potasio p.a., 12 mL de etanol y 120 mg de hidroquinona p.a. Se colocó un tubo refrigerante y se calentó en baño de agua a 70 - 80°C durante 45 minutos. Inmediatamente, sin enfriar, se realizó la extracción.

#### Extracción

Se trasladó la muestra a una ampolla de decantación color caramelo con 6 mL de solución saturada de cloruro de sodio p.a. Se realizaron dos extracciones con 15 mL de hexano p.a. Ambas fases de hexano se recogieron en un balón, previa filtración por papel de filtro Whatman N° 2 que contenía sulfato de sodio anhidro p.a. y se evaporaron en rotavapor (temperatura no mayor de 40°C) hasta sequedad. Inmediatamente antes de la inyección se reconstituyó la vitamina A con 1,0 mL de metanol HPLC.

Para el blanco de reactivos se realizó el proceso de saponificación y de extracción en ausencia de leche materna.

Todas las muestras fueron procesadas por duplicado y cada replicado se inyectó dos veces.

#### Estudio estadístico

Para la evaluación estadística de los resultados se aplicó el test de ANOVA. El nivel de significación se fijó en un 5%. Se utilizó el programa InStat versión 3.01.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Desarrollo y validación del método analítico

Para el desarrollo del método se realizó una búsqueda bibliográfica acerca del contenido promedio de vitamina A en leche materna (5, 10) y se estudió la respuesta del estándar cuando se utiliza un detector de fluorescencia. Se estableció que, debido a la alta sensibilidad de esta metodología, es posible trabajar con 500  $\mu$ L de leche materna, a los fines de cuantificar vitamina A, aún en muestras deficientes, cuando la muestra es saponificada, extraída y posteriormente reconstituida con 1,0 mL de metanol.

Se optimizó la resolución de la separación cromatográfica trabajando con muestras reales. Para ello se aumentó progresivamente la proporción de agua en la fase móvil, hasta 9%, sin alterar el factor de asimetría del pico de análisis.

La saponificación de las muestras se realizó según la metodología descrita por Escrivá y col. (8) reemplazando la utilización de ácido ascórbico por hidroquinona como antioxidante.

Para establecer la linealidad se realizaron 6 diluciones del estándar y cada una se inyectó tres veces. Se demostró respuesta lineal en el rango de 0,05 – 1,50 µg/mL (n= 18), con un coeficiente de correlación de 0,9995; ecuación de la recta  $y = 2029x + 14,6$  y un error estándar de 0,0139.

La determinación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) fue realizada en base a la desviación estándar de la respuesta del blanco y a la pendiente de la curva de linealidad, obteniéndose valores de 0,010 µg/mL para el LD y de 0,025 µg/mL para el LC.

Para evaluar la exactitud del método se determinó el nivel basal de vitamina en una muestra proveniente de una mujer sana (n=6), luego se realizó la adición de vitamina A en cantidades correspondientes al 50%, 100% y 125% del nivel basal. Las muestras de cada nivel se procesaron por triplicado. El porcentaje de recuperación promedio fue  $83,8 \pm 6,9$  (n= 9) (Tabla 1).

**TABLA 1**  
Recuperación de vitamina A en leche materna correspondiente a 50%, 100% y 125% de adición respecto del nivel basal de la muestra

	Nivel 50 %	Nivel 100 %	Nivel 125 %	Promedio ± DE
Recuperación (%) <sup>a</sup> ± DE	80,7 ± 8,7	91,6 ± 2,7	79,0 ± 5,3	83,8 ± 6,9

<sup>a</sup> n= 3

Se evaluó la precisión como el desvío estándar relativo (RSD) en el día y entre días. Para ello se realizaron 5 determinaciones de una muestra durante tres días consecutivos. Cada día se trabajó con una alícuota distinta de la misma muestra mantenida a -20°C y al abrigo de la luz. Para el ensayo en el día (n= 5) se obtuvo un RSD de 9,0% y para el ensayo entre días (n= 15) un RSD de 8,9% (Tabla 2).

Los resultados obtenidos para la exactitud y precisión del método analítico responden a las tolerancias recomendadas para este tipo de muestra y para esta concentración de analito (11).

### Cuantificación de vitamina A en muestras de una población rural

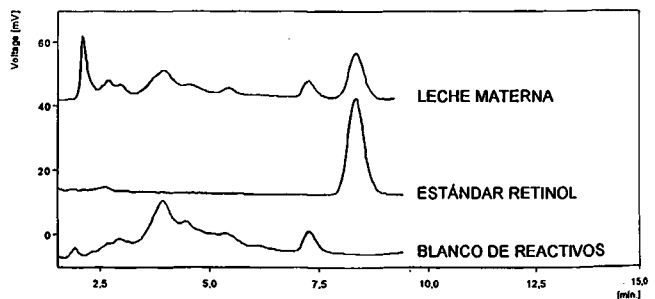
En la Figura 1 se observan, a modo de ejemplo, los cromatogramas correspondientes a blanco de reactivos, estándar de vitamina A y leche materna.

**TABLA 2**  
Precisión del método analítico en el día y entre días

	Promedio (µg / mL)	DE (µg / mL)	RSD (%)
En el día <sup>a</sup>	0,598	0,054	9,0
Entre días <sup>b</sup>	0,601	0,054	8,9

<sup>a</sup> n=5, <sup>b</sup> n=15

**FIGURA 1**  
Cromatogramas correspondientes a blanco de reactivos, estándar de retinol (0,47 µg / mL) y leche materna. Las condiciones cromatográficas se describen en Materiales y Métodos



En la Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes a las 223 muestras analizadas. No se observaron diferencias significativas en el contenido de vitamina A entre los tres meses analizados. Los valores hallados fueron similares a los de bibliografía (1), los cuales indican que durante los primeros seis meses, en poblaciones con suficiente vitamina A, el rango de concentración promedio de retinol en leche materna es de 0,50 a 0,70 µg/mL. En el presente estudio, para los tres meses analizados el promedio fue de  $0,62 \pm 0,31$  µg/mL.

**TABLA 3**  
Concentraciones de vitamina A (µg/mL) en leches humanas correspondientes a 5°, 6° y 7° mes posparto

n	5° mes 75	6° mes 80	7° mes 68	p
Promedio ± DE	0,60 ± 0,32	0,65 ± 0,33	0,61 ± 0,26	n.s.
Rango	0,13 – 2,39	0,19 – 1,83	0,24 – 1,84	

Las ingestas recomendadas de vitamina A son de 400  $\mu\text{g}/\text{día}$  para bebés de 0 – 6 meses y de 500  $\mu\text{g}/\text{día}$  para bebés de 7-12 meses (10). Estas cifras se calcularon teniendo en cuenta que el nivel promedio de vitamina A en leche humana entre 0 y 12 meses es de 0,485  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para el cálculo del primer grupo (0 -6 meses) se tuvo en cuenta que la producción promedio de leche por día es de 780 mL. Para el segundo grupo (7 - 12 meses) se debe sumar el aporte estimado debido a la alimentación complementaria (244  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y el aporte correspondiente a la leche materna (promedio de producción 600 mL) equivalente a 291  $\mu\text{g}/\text{día}$  (10). De acuerdo con estos datos consideramos que los bebés que sólo ingieren leche materna con valores inferiores a 0,40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  podrían no cubrir sus necesidades diarias de vitamina A.

Según nuestros resultados diecinueve muestras del 5º mes (n=75), catorce muestras del 6º mes (n= 80) y diez muestras del 7º mes (n= 68) presentaron valores de vitamina A por debajo de 0,40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esto indica que el 19,3% de las muestras analizadas presentaron valores de vitamina A característicos de poblaciones deficientes.

### CONCLUSIONES

Los parámetros analíticos de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión del método para el ensayo en el día y para el ensayo entre días demuestran que el método desarrollado permite cuantificar, en forma eficiente, vitamina A en muestras de leche humana.

Un elevado porcentaje (80,7%) de las muestras correspondientes a una población rural de Santiago del Estero, Argentina, presentaron niveles de vitamina A suficientes para cubrir las necesidades metabólicas del bebé aún en el caso de ser amamantados en forma exclusiva. Sin embargo el 19,3% de la población presentó valores de vitamina A compatibles con poblaciones deficientes (menor a 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Sería necesario evaluar si estos niños reciben alimentación complementaria suficiente para cubrir sus necesidades diarias de esta vitamina.

Dado que en la Argentina no se cuenta con información acerca de los niveles de vitamina A en leche materna, se propone esta metodología para realizar un estudio de los niveles de retinol en muestras de mujeres en distintas etapas de la lactancia, de diferentes estratos socioeconómicos y de diversas regiones del país a fin de establecer la adecuación con respecto a la vitamina A de los niños amamantados.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las autoridades del Hospital Distrital de Forres por su apoyo en la realización del presente trabajo.

### REFERENCIAS

1. World Health Organization. 1996. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. WHO/NUT/96 10. WHO, Geneva, Switzerland.
2. Muslimatun S, Schmidt MK, West CE, Schültink W, Hautvast JGAJ, Karyadi D. Weekly vitamin A and iron supplementation during pregnancy increases vitamin A concentration of breast milk but not iron status in Indonesian lactating women. *J Nutr.* 2001; 131:2664- 2669.
3. Ortega RM, Andrés P, Martínez RM, López- Sobaler AM. Vitamin A status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: Influence of concentration of vitamin A in breast milk. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66 (3): 564-8.
4. Gross R, Hansel H, Schultink W, Shrimpton R, Matulesi P, Gross G et al. Moderate zinc and vitamin A deficiency in breast milk of mothers from East- Jakarta. *Eur. J Clin Nutr.* 1998; 52 (12): 884- 90.
5. Jensen RG, Editor. Handbook of milk composition New York: Academic Press; 1995.
6. Chase WG. En: *Infant Formulas, Baby Foods, and Enteral Products.* AOAC International, 17 th ed. 2000; Chapter 50. p.1-3.
7. Ake M, Fabre H, Malan AK, Mandrou B. Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powder milk and local flour: A validation procedure. *J Chromat. A.* 1998; 826: 183 -189.
8. Escrivá A, Esteve MJ, Farré R, Frígola A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *J Chromat. A.* 2002; 947: 313-318.
9. Tanumihardjo SA, Penniston KL. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J Lipid Res.* 2002; 43 (2): 350-5.
10. Food and Nutrition Board. Institute of medicine. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.* Washington: National Academy Press; 2001.
11. Appendix E: Laboratory Quality Assurance. AOAC. Association of Official Analytical Chemist. *Official Methods of Analysis*, 17 th. ed; Horwitz W. Ed. Washington, DC. 2000.

Recibido: 07-11-2003

Aceptado: 16-05-2005

## Déficit estatural em crianças em idade escolar: uma análise multivariada de possíveis fatores de risco, Pernambuco - 1997

*Laurentino GEC, Arruda IKG, Raposo MCF, Batista Filho M*

Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Brasil.  
Instituto Materno Infantil de Pernambuco-IMIP. Brasil.

**RESUMO.** Utilizando dados da II Pesquisa Estadual Sobre Alimentação, Saúde e Nutrição do Estado de Pernambuco-Brasil, desenvolvida em 1997, analisou-se o estado nutricional e alguns fatores de risco de 894 crianças em idade escolar (6 a 12 anos) do Estado de Pernambuco - Brasil. O ponto de corte usado na avaliação nutricional foi o limite referente a -2 escore-Z, tendo como padrão de referência o NCHS. A prevalência do nanismo nutricional no estado foi de 16,9% e o espaço geográfico mais atingido o Interior Rural com 27,1%. A análise bi-variada mostrou que o baixo nível socioeconômico das crianças e de suas famílias está associado à ocorrência do déficit estatural e, o modelo de regressão logística indicou as variáveis: local de residência, gênero, tratamento da água de beber, déficit de escolaridade e renda per capita como principais determinantes do nanismo nutricional. A análise conjunta dos múltiplos fatores explicativos para o déficit estatural encontrado nas crianças estudadas, mostrou que a probabilidade de uma criança em idade escolar apresentar déficit estatural variou, dependendo dos fatores de risco considerados, de 1,5 a 60,3% configurando assim, diferentes "cenários" epidemiológicos. O estudo concluiu ainda que no Estado de Pernambuco o déficit estatural constitui um problema de saúde pública especialmente para as crianças em idade escolar residentes nas áreas rurais, retratando duas realidades epidemiológicas bem diferentes entre os meios urbanos e rurais.

**Palavras chaves:** Nanismo nutricional, Saúde escolar, Escolares, Déficit Estatural.

**SUMMARY.** Height deficit in school aged children: a multivariate analysis of possible risk factors, Pernambuco-1997 The nutritional status and some risk factors in 894 school children (ages 6 to 12) in the State of Pernambuco, Brazil, were analyzed based on the data collected by the Second State Research on Nourishment, Health and Nutrition carried out in 1997. The cutoff point used in the nutritional evaluation was the limit referring to -2 score-Z, being the NCHS the reference standard. The prevalence of stunting in the state was of 16.9%. Rural areas were more affected, reaching 27.1%. Bivariate analysis showed that the low socioeconomic level of the children and their families is associated with the occurrence of stunting. The logistic regression model pointed the variables: residence location, gender, access to treated potable water, low education, and per-capita income as the main determinants in stunting. The conjunct analysis of all the factors that explain the malnutrition found among the school children studied showed that the probability of a school-aged child to present height deficit varied from 1.5 to 60.3% depending on the risk factors taken into account, therefore showing different epidemiological "scenarios." The study also concluded that in the State of Pernambuco the height deficit constitutes a public health problem especially for school children in rural areas, showing two very different epidemiologic realities between urban and rural areas.

**Key words:** Stunting, Health in school children, School-aged children, Height deficit.

### INTRODUÇÃO

O retardo estatural, denominado "stunting" na literatura internacional (1,2) ou "nanismo" nutricional, expressão preferida por autores brasileiros (3,4), constitui a característica antropométrica que melhor representa o quadro epidemiológico da desnutrição energético-proteica tanto em nível mundial (5) quanto nacional (6).

Afetando o crescimento esquelético e, assim, comprometendo a medida dominante das relações corporais (a estatura), os efeitos sinérgicos da desnutrição primária e

dos estresses infecciosos de elevada prevalência e relevante ação patogênica se refletem, cumulativamente, no retardo do crescimento linear, estabelecendo padrões fenotípicos que definem, no tempo, espaço geográfico e em relação a diferentes grupos populacionais, o resultado dos ajustes entre o potencial genético e as condições do meio ambiente. Com esta compreensão, além do interesse específico na área de nutrição, os estudos sobre os parâmetros de estatura representam um indicador genérico das condições coletivas de saúde (7,8).

Em função do reconhecimento consensual de sua

importância no período crítico dos primeiros meses e anos de vida, o crescimento e o estado de nutrição de crianças menores de cinco anos têm sido objetos de incontáveis estudos clínicos e epidemiológicos em todo o mundo, principalmente nos países e regiões onde as condições socioeconômicas são adversas, configurando os ecossistemas da pobreza, com suas várias representações e componentes (9,10). No entanto, na idade escolar, o processo de crescimento físico e, mais genericamente a própria condição nutricional, não têm sido devidamente valorizados, sendo escassas as pesquisas que tratam da magnitude do problema, suas características e fatores associados.

Tal desinteresse resulta, possivelmente, das evidências de que o crescimento na idade escolar reflete o efeito cumulativo e residual de processos prévios, que seriam cruciais nos primeiros anos de vida, quando efetivamente, o problema deveria ser considerado como de saúde pública. A valorização deste conceito pode ser representada na recomendação, em grande parte promovida por alguns organismos internacionais (11) de que a avaliação da estatura dos escolares poderia ser referenciada, por razões de facilidade logística, como uma forma indireta de se estimar a própria situação dos menores de cinco anos, de aferição mais difícil, demorada e custosa. Seria, portanto, um indicador *proxi*, fundamentada na hipótese de colinearidade das duas situações (11,12).

No caso do Brasil e, em grande parte dos países latino-americanos, três aspectos devem ser considerados, justificando o interesse próprio de se avaliar o crescimento e o estado nutricional dos escolares. Em primeiro lugar, o rápido processo de transição nutricional, implicando em diferenças sensíveis entre os dois grupos etários, menores de cinco anos e escolares, separados por um período de cinco a oito anos (13). O segundo, se refere ao caráter socialmente seletivo das escolas, de forma que parte considerável das crianças em idade escolar não se acha matriculada na rede de ensino, deixando, assim, de representar a composição do universo social (14). O terceiro argumento refere-se a associação evidenciada em estudos no Brasil do estado nutricional com o desempenho no processo de aprendizagem (15,16).

É, portanto, nesta perspectiva que se justifica o presente estudo que, utilizando dados da II Pesquisa de Saúde e Nutrição do Estado de Pernambuco-1997, teve como objetivo principal a identificação de fatores socioeconômicos e biológicos que pudessem melhor explicar o nanismo nutricional em crianças em idade escolar do Estado de Pernambuco de modo a contribuir na definição e avaliação de políticas públicas mais adequadas à resolução do problema.

## CASUÍSTICA E MÉTODO

O estudo, do tipo corte transversal, foi desenvolvido tendo como fonte principal de dados o arquivo da II Pesquisa Estadual de Saúde e Nutrição do Estado de Pernambuco – 1997. O detalhamento do método utilizado no referido estudo se encontra disponível em publicação própria (17). A amostra do tipo probabilística (aleatória estratificada) e estatisticamente representativa para as três áreas geográficas estudadas, Região Metropolitana do Recife-RMR, Interior Urbano-IU e Interior Rural-IR, foi definida para permitir representação das crianças menores de cinco anos. Entretanto, é possível considerar que as crianças em idade escolar, residentes em habitações onde foram encontrados os menores de cinco anos, quase sempre, irmãs, representem o universo de crianças nesta idade para o Estado de Pernambuco. Desta forma, foram identificadas 1.013 crianças em idade escolar, na faixa etária de 6 a 12 anos, dos quais, 119 (11,7%) não foram estudados por falta de informações antropométricas, totalizando 894 escolares pesquisados.

A variável dependente estudada foi o *déficit* estatural segundo o indicador altura/idade (*A/I*), tomando-se como ponto de corte o limite referente a -2 escore-Z ( $Z < -2$ ), tendo como referência o padrão do *National Center of Health Statistics (NCHS)*, recomendado pela Organização Mundial de Saúde para uso internacional na avaliação nutricional de crianças (1). Assim, foram consideradas baixas para a idade as crianças classificadas abaixo de -2 escore-Z ( $Z < -2$ ) e eutróficas (altura adequada para a idade) aqueles com valores maiores ou iguais a -2 ( $Z \geq 2$ ). Neste trabalho, o termo “escolar” por vezes será utilizado como referência às crianças em idade escolar.

Para o estudo de associação entre o *déficit* estatural e os possíveis fatores de risco, foram utilizadas, além de variáveis biológicas como gênero e idade, algumas variáveis socioeconômicas da família e a variável “*déficit* de escolaridade”. Para a escolha desta variável partiu-se do pressuposto de que a escola, sendo considerada um espaço estratégico para formação de hábitos alimentares saudáveis e para o acesso a uma alimentação adequada, pode funcionar como um fator de proteção (18).

Embora os mecanismos utilizados para a coleta dos dados na II Pesquisa Estadual de Saúde e Nutrição do Estado de Pernambuco-1997 (17), da qual se originou este estudo, não permitam afirmar que durante a sua realização as crianças em idade escolar estivessem freqüentando a escola, as informações sobre a última série cursada possibilitaram estimar o *déficit* de escolaridade. Assim, a partir da informação disponível sobre a última série cursada no ensino fundamental foi calculada a variável *déficit* de escolaridade, usando o seguinte critério: crianças de 6 e 7

anos de idade não tem *déficit* de escolaridade (valor=0); crianças de 8 anos, teoricamente, deveriam contar um ano de escolaridade e, caso não tivessem, teriam um ano de *déficit* de escolaridade, no mesmo raciocínio; crianças de 9 anos poderiam ter um ou, no máximo, dois anos de *déficit*, e assim por diante, até um máximo de 4 anos de *déficit* de escolaridade para crianças de 11 anos que nunca foram à escola, ou que não tivessem concluído pelo menos a primeira série.

A idade, avaliada em anos, foi categorizada em duas faixas etárias, de 6 a menos de 10 (6-10) e maior ou igual a 10 ( $\geq 10$ ). As variáveis socioeconômicas estudadas foram: abastecimento de água, através da rede geral (com canalização interna) e de outras formas (incluindo poço ou nascente, chafariz, rede geral sem canalização interna e outras formas); tratamento da água de beber, considerando tratada (fervida, filtrada, mineral ou clorada) e sem tratamento (coada, sem tratamento e outras formas); esgotamento sanitário: sanitário ligado à rede geral, sanitário ligado à fossa com tampa e outras formas (incluindo sanitário ligado à fossa rudimentar); destino do lixo, coletado e outras formas (incluindo a colocação em terreno baldio e outras formas); posse de geladeira; renda familiar mensal e renda *per capita*.

Para a renda familiar mensal foram consideradas as rendas totais da família incluindo renda do trabalho e de outras fontes. A renda então obtida foi transformada para efeito de análise comparativa, em frações do salário mínimo (SM) adotando-se as seguintes categorias: abaixo de 1 SM ( $< 1SM$ ), de 1 a menos de 2 SM (1-2) e maior ou igual a 2 SM ( $\geq 2SM$ ). A renda *per capita* foi calculada dividindo-se a renda familiar total pelo número de pessoas do domicílio. Tal como no caso da renda familiar, utilizouse a transformação para salário mínimo, adotando-se a seguinte estratificação: abaixo de  $\frac{1}{2}$  do SM ( $< 0,25$ ), de  $\frac{1}{2}$  a menos de meio SM (0,25-0,50) e maior ou igual a 0,50 SM ( $\geq 0,50$ ). Na ocasião da pesquisa um salário mínimo correspondia à R\$120,00 (equivalente a US\$ 113,42).

Para a análise estatística dos resultados foi feita, inicialmente, uma análise bivariada adotando-se o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de associação de Pearson e, quando pertinente, a correção de Yates, para testar a associação entre o estado nutricional e os possíveis fatores de risco, além de calcular o valor da *Odds Ratio* (OR) para ocorrência de *déficit* estadual, em algumas situações de interesse. No caso de variáveis com mais de duas categorias, sendo estas ordinais, foi utilizado o teste Qui-quadrado para tendência linear.

Posteriormente, foi ajustado um modelo de regressão logística, considerando como resposta de interesse a ocorrência de *déficit* estadual ( $Y=1$  representando a criança com *déficit* e  $Y=0$  a criança eutrófica) e, como

fatores de risco, denominados variáveis explicativas, todas aquelas variáveis biológicas e socioeconômicas com associação estatística com a condição nutricional das crianças em idade escolar, utilizando como critério de seleção o método *stepwise*.

Para aplicação do modelo de regressão foram consideradas como variáveis "candidatas" aquelas que na análise bi-variada apresentaram um nível de significância de no máximo 10%, para então aceitar como variáveis participantes do modelo aquelas com valor máximo de 5%, garantindo, desta forma, 95% de confiança em todos os cálculos ( $p \leq 0,05$ ). No caso da variável *déficit* de escolaridade, foi utilizado a quantidade de anos de *déficit* como uma variável contínua e não categórica. A partir do modelo ajustado, foi possível estimar a probabilidade de *déficit* estadual, nas crianças em idade escolar, controlando-se os possíveis fatores de risco.

Como plataforma computacional foram utilizados os *software's* EPI-INFO, versão 6.02 e SPSS, versão 10.0 para Windows.

## RESULTADOS

Na Tabela 1 estão contidas as análises efetuadas para estabelecer possíveis relações entre o estado nutricional das crianças em idade escolar e fatores biológicos e socioeconômicos. Conforme observado, a prevalência de *déficit* estadual ( $Z < -2$ ) no Estado de Pernambuco foi de 16,9%. Entre os estratos geográficos, o IR foi a região que apresentou os maiores percentuais (27,1%), sendo praticamente equivalentes no IU (8,8%) e na RMR (9,6%).

Escolares residentes no IR apresentaram maiores riscos de *déficit* estadual ( $OR= 3,48$ ) quando comparados com aqueles residentes na RMR. Para o total da amostra, com exceção da idade, todas as variáveis estudadas se mostraram estatisticamente associadas ao estado nutricional dos escolares avaliados, conforme se pode constatar na Tabela 1. Em todos os casos, observase pelos valores das OR que a prevalência de *déficit* estadual aumenta à medida que pioram as condições socioeconômicas. Com relação ao *déficit* de escolaridade, constatase que, quanto maior o *déficit* maior a prevalência de crianças com baixa estatura. Assim, crianças com 4 anos de *déficit* de escolaridade tem uma chance 5,24 vezes maior de apresentar baixa estatura em relação aos que não tem *déficit*. O esgotamento sanitário feito por "outras formas" determinou risco de baixa estatura 7,36 vezes maior do que quando realizado pela rede geral. A prevalência de *déficit* estadual foi inversamente proporcional à renda, observandose que escolares com renda *per capita* inferior a  $\frac{1}{2}$  do SM estão expostos a riscos 10,72 vezes maior em relação ao grupo com renda maior ou igual a  $\frac{1}{2}$  SM *per capita*.

TABELA 1.  
Prevalência de *déficit* estatural em crianças em idade escolar, segundo algumas variáveis de interesse, Pernambuco -1997. (continua)

VARIÁVEIS	Total <sup>(1)</sup> N	ALTURA/IDADE				OR	ESTAT.
		Z < -2		Z ≥ 2			
	N	N	%	N	%		
Local de residência							
RMR	249	24	9,6	225	90,4	1	$\chi^2=49,88$
IU	261	23	8,8	238	91,2	0,91	p=0,0000
IR	384	104	27,1	280	72,9	3,48	
ESTADO	894	151	16,9	743	83,1	-	
Gênero							
Feminino	459	59	12,9	400	87,1	1	$\chi^2=10,37$
Masculino	435	92	21,1	343	78,9	1,82	p=0,0013
Idade (em anos)							
6 —10	645	103	16,0	542	84,0	1	$\chi^2=1,17$
10 —12	249	48	19,3	201	80,7	1,26	p=0,2784
Déficit de escolaridade (em anos)							
0	562	72	12,8	490	82,7	1	
1	156	30	19,2	126	80,8	1,62	$\chi^2=25,36$ (*)
2	96	24	25,0	72	75,0	2,27	p=0,0000
3	57	15	26,3	42	73,7	2,43	
4	23	10	43,5	13	56,5	5,24	
Abastecimento de água							
Rede Geral	412	37	9,0	375	91,0	1	$\chi^2=33,02$
Outras Formas	482	114	23,7	368	76,3	3,14	p=0,0000
Tratamento de água de beber							
Tratada	439	42	9,6	397	90,4	1	$\chi^2=31,94$
Sem Tratamento	455	109	24,0	346	76,0	2,98	p=0,0000

Os totais não são necessariamente iguais devido à eventual falta de informação em relação ao registro de algumas variáveis.

(\*) Resultado do teste Qui-quadrado para tendência.

Os resultados dos testes estatísticos de associação entre a condição nutricional e as variáveis biológicas e socioeconômicas em cada estrato geográfico, encontram-se apresentados de forma resumida na Tabela 2. Observase que na RMR apenas as variáveis tratamento da água de beber, posse de geladeira e renda *per capita* se mostraram estatisticamente associadas ao estado nutricional. No IU

apenas a variável renda *per capita* se associou com o estado nutricional das crianças investigadas, enquanto no IR, o gênero, tratamento da água de beber, renda familiar e renda *per capita* mostraram associação estatisticamente significativa com a classificação nutricional, além do *déficit* de escolaridade com p=0,0700. Em todos os estratos estudados, tal como no estado como um todo, a

TABELA 1.  
Prevalência de *déficit* estatural em crianças em idade escolar, segundo algumas variáveis de interesse, Pernambuco -1997. (conclusão)

VARIÁVEIS	Total <sup>(1)</sup> N	Z < -2		Z ≥ 2		OR	ESTAT.
		N	%	N	%		
<b>ALTURA/IDADE</b>							
Esgotamento Sanitário							
San. ligado à rede geral	175	8	4,6	167	95,4	1	$\chi^2=51,85$
San. ligado à fossac/tampa	293	32	10,9	261	89,1	2,56	p=0,0000
Outras Formas	426	111	26,1	315	73,9	7,36	
Destino do Lixo							
Coletado	368	29	7,9	339	92,1	1	$\chi^2=35,09$
Outras Formas	526	122	23,2	404	76,8	3,53	p=0,0000
Posse de Geladeira							
Tem	441	42	9,5	399	90,5	1	$\chi^2=32,62$
Não Tem	453	109	24,1	344	75,9	3,01	p=0,0000
Renda Familiar							
≥2SM	416	46	11,1	370	88,9	1	
1 — 2SM	264	53	20,1	211	79,9	2,02	$\chi^2=20,85^{(*)}$
≥1SM	186	47	25,3	139	74,7	2,72	p=0,0000
Renda <i>per capita</i>							
≥0,50	195	6	3,1	189	96,9	1	
0,25 — 0,50	285	42	14,7	243	85,3	5,44	$\chi^2=47,29^{(*)}$
< 0,25	386	98	25,4	288	74,6	10,72	p=0,0000

Os totais não são necessariamente iguais devido à eventual falta de informação em relação ao registro de algumas variáveis.

(\*) Resultado do teste Qui-quadrado para tendência.

renda *per capita* apresentou uma associação inversamente proporcional com a ocorrência percentual de *déficit* estatural, que diminui à medida que aumenta o nível de renda.

Os resultados apresentados em cada estrato geográfico revelaram que em todos eles as diferenças na prevalência são estatisticamente significativas segundo a renda *per capita*.

Na análise multivariada dos fatores de risco para o *déficit* estatural, feita a partir do modelo de regressão logística, foram consideradas todas as variáveis que, na análise bi-variada apresentaram um nível de significância de no máximo 10%, ou seja, foram utilizadas todas as variáveis exceto a idade das crianças. A partir destes resultados, foram calculados os valores das *odds ratios* ajustados para os fatores de risco significativos, bem como as probabilidades de baixa estatura estimadas pelo modelo em cada situação de interesse.

A Tabela 3 mostra os *odds ratios* resultantes da análise bivariada e da multivariada, constatandose que as variáveis explicativas para o *déficit* estatural em crianças em idade escolar foram: local de residência (estrato geográfico), gênero, tratamento da água de beber, renda *per capita* e *déficit* de escolaridade. Conforme pode ser observado, as variáveis que na análise bivariada determinaram as maiores chances de *déficit* estatural nos escolares investigados (renda *per capita* mais baixa e ter residência no IR) permaneceram como os maiores determinantes no modelo multivariado (OR= 5,10 e 2,50 respectivamente).

As probabilidades de *déficit* estatural em crianças em idade escolar, estimadas pelo modelo, encontramse detalhadas na Tabela 4. Observase que a probabilidade de *déficit* estatural diminui quando aumenta a renda *per capita*, com as demais variáveis controladas. Quando existe

TABELA 2.  
Resultados do teste  $\chi^2$  de associação entre nutricional (altura/idade) de crianças em idade escolar e algumas variáveis de interesse por estrato geográfico, Pernambuco - 1997

VARIÁVEIS	ESTRATO		
	RMR	IU	IR
Gênero	$\chi^2_{1}=1,11$ p=0,2923	$\chi^2_{1}=0,11$ p=0,7430	$\chi^2_{1}=9,74$ p=0,0018
Idade	$\chi^2_{1}=0,76$ p=0,3843	$\chi^2_{1}=0,04$ p=0,8354	$\chi^2_{1}=0,67$ p=0,4119
Déficit de escolaridade	(**)	(**)	(**)
Abastecimento de água	$\chi^2_{1}=1,08$ p=0,2981	$\chi^2_{1}=0,00$ p=0,9789	$\chi^2_{1}=2,70$ p=0,1005
Tratamento de água de beber	$\chi^2_{1}=6,28$ p=0,0122	$\chi^2_{1}=0,00$ p=0,9789	$\chi^2_{1}=11,91$ p=0,1005
Esgotamento Sanitário	$\chi^2_{2}=4,83$ p=0,0895	$\chi^2_{2}=3,10$ p=0,2123	(**)
Destino do lixo	$\chi^2_{1}=0,59$ p=0,4407	$\chi^2_{1}=0,43$ p=0,5116	$\chi^2_{1}=3,73$ p=0,0535
Posse de geladeira	$\chi^2_{1}=5,32$ p=0,0210	$\chi^2_{1}=1,97$ p=0,1601	$\chi^2_{1}=3,44$ p=0,0636
Renda Familiar	$\chi^2_{2}=1,21$ p=0,2711	$\chi^2_{2}=3,665^{(*)}$ p=0,0556	$\chi^2_{2}=6,21$ p=0,0127
Renda <i>per capita</i>	$\chi^2_{2}=6,49^{(*)}$ p=0,0108	$\chi^2_{2}=8,039^{(*)}$ p=0,0046	$\chi^2_{2}=14,82^{(*)}$ p=0,0000

(\*) Resultado do teste Qui-quadrado para tendência.

(\*\*) Devido às restrições de amostra, não foi possível fazer o teste para estratos geográficos

tratamento da água de beber as probabilidades de uma criança em idade escolar apresentar *déficit* estatural são menores comparadas às situações do não tratamento. Em relação à interferência do *déficit* de escolaridade constata-se que as probabilidades de baixa estatura são bem maiores para crianças com 4 anos de *déficit* comparado com aquelas que não tem *déficit*, controlando-se as demais variáveis significativas. Pode-se destacar ainda que na melhor condição (residir no IU, ser do gênero feminino, não ter *déficit* de escolaridade, utilizar água de beber tratada e ter a melhor condição de renda) o escolar tem apenas 1,5% de probabilidade de apresentar *déficit* de estatura, enquanto

na pior condição (residir no IR, ser do gênero masculino, ter quatro anos de *déficit* de escolaridade, não tratar a água de beber e ter renda *per capita* inferior a 0,25 (SM) esta probabilidade se eleva para 60,3% .

## DISCUSSÃO

Em termos estatísticos e de acordo com a curva normal de crescimento, espera-se, em uma população sadia e com oportunidade de se desenvolver fisicamente sem restrições de natureza ambiental, menos de 1% de *déficit* antropométrico grave e cerca de 2,3% de *déficit* modera-

TABELA 3.  
Resumo dos resultados das análises bi e multivariada para explicar o *déficit* estatural em crianças em idade escolar, Pernambuco -1997.

Variáveis	Análise bi-variada <sup>(1)</sup>	Análise multivariada <sup>(1)</sup>
	OR(IC)	OR(IC)
Local de residência <sup>(2)</sup>		
RMR	1	1
UR	0,91(0,50; 1,65)	0,94 (0,50; 1,75)
Gênero		
Feminino	1	1
Masculino	1,82 (1,27; 2,60)	1,97 (1,25; 2,89)
Tratamento de água de beber		
Tratada	1	1
Sem Tratamento	1,98 (2,03; 4,37)	1,89 (1,24; 2,89)
Renda <i>per capita</i> (*)		
< 0,50	1	1
0,25  — 0,50	5,44 (2,27; 13,07)	2,94 (1,26; 6,86)
< 0,25	10,72 (4,61; 24,94)	5,10 (2,23; 11,63)
Déficit de escolaridade <sup>(2)</sup>		
(Em anos) <sup>(2)</sup>		
0	1	1.24 (1,06; 1,46)
1	1,62 (1,01; 2,59)	
2	2,27 (1,34; 3,83)	
3	2,43 (1,28; 4,60)	
4	5,24 (2,21; 12,38)	

(\*) teste Qui-quadrado para tendência

(1) Todos com  $p < 0,01$ ; (2) Variável considerada na análise multivariada como contínua.

do. Se em um determinado grupo populacional for constatado que a proporção de crianças cujo escore-Z do indicador utilizado na avaliação nutricional é substancialmente superior a 2,3%, tem-se um indicativo de que as condições de saúde e nutrição são inadequadas (1,5).

Os resultados deste trabalho mostraram uma prevalência de (16,9%) de *déficit* estatural (grave/moderado) nas crianças em idade escolar do Estado de Pernambuco e, portanto, muito superior ao esperado para uma população sadia. Na verdade, este resultado constitui um achado frequente na maioria dos estados nordestinos. Três censos de altura de escolares realizados na década de 90 nos Estados da Paraíba (19), Ceará (20) e Piauí (21) encontraram prevalências de *déficits* estaturais ( $Z < -2$ ) de 17,86%, 17,2% e 28% respectivamente. No Estado de Sergipe, na mesma década, um diagnóstico de saúde escolar da cidade de Aracaju encontrou 39,5% de *déficit* estatural com as formas grave/moderada atingindo 11,0% (22). Já estudos

envolvendo escolares de outras regiões brasileiras evidenciaram prevalências bem mais baixas como em Osasco, na Grande São Paulo, onde a prevalência do retardo de crescimento ( $Z < -2$ ) foi de 4,8% (23). Na cidade do Rio de Janeiro, Anjos et al. (24), encontraram uma prevalência de *déficit* estatural de 1,9 e 2,8% respectivamente para meninas e meninos indicando que o *déficit* de estatura não constitui um problema encontrado em escolares deste município. Em Florianópolis, capital de Santa Catarina, Corso et al. (25) evidenciaram uma prevalência de 3,1% de *déficit* estatural nos escolares estudados.

Desta forma, observase que a prevalência de *déficit* estatural em crianças em idade escolar do Estado de Pernambuco assemelha-se à encontrada em outros estados nordestinos como Paraíba e Ceará, apresentando valores bem acima dos encontrados em populações que desfrutam de melhores condições socioeconômicas, confirmando uma realidade que vem se mantendo durante décadas, de

TABELA 4.  
 Probabilidades estimadas de *deficit* em crianças em idade escolar, segundo variáveis explicativas (%)  
 Pernambuco -1997.

Déficit de escolaridade	Estrato	Gênero	Água de beber não tratada			Água de bebe tratada		
			Renda <i>per capita</i>			Renda <i>per capita</i>		
			<0,25	0,25   — 0,5	≥0,50	<0,25	0,25   — 0,5	≥0,25
Quatro anos de <i>deficit</i>	IR	Mas	60,3	47,7	24,1	45,4	33,0	14,7
		Fem	44,8	32,5	14,4	30,5	20,7	8,3
	IU	Mas	37,9	26,5	11,2	24,8	16,4	6,4
		Fem	24,4	16,0	6,2	14,9	9,4	3,5
	RMR	Mas	39,2	27,7	11,8	25,9	17,2	6,7
		Fem	25,4	16,8	6,6	15,6	9,9	3,7
Sem <i>deficit</i>	IR	Mas	39,1	27,6	11,7	25,8	17,1	6,7
		Fem	25,3	16,7	6,6	15,5	9,8	3,7
	IU	Mas	20,3	13,1	5,0	12,1	7,6	2,8
		Fem	11,9	7,4	2,7	6,8	4,1	1,5
	RMR	Mas	21,2	13,8	5,3	12,7	8,0	2,9
		Fem	12,5	7,8	2,9	7,2	4,4	1,6

que as crianças nordestinas estão expostas a riscos de desnutrição bem superiores àqueles encontrados nas demais macrorregiões do país como Sul, Sudeste e Centro-Oeste (26).

Outra constatação, já bem consolidada, é a grande diferença na prevalência da desnutrição entre populações urbanas e rurais. Sabidamente, as zonas rurais são as que reúnem as piores condições de vida, com interferência direta sobre a saúde de seus moradores: Assim, o fato de 9,6% das crianças em idade escolar da RMR terem sido classificadas como casos de nanismo enquanto no IR este valor foi quase três vezes maior (27,1%) vêm confirmar outros achados (19,27) de que o *deficit* estatural tem predomínio significativamente maior em escolares do meio rural.

Os resultados obtidos a partir da análise bivariada, realizada em cada estrato geográfico, mostraram que em todos eles, as diferenças na prevalência, são estatisticamente significantes segundo a renda *per capita*. A importância dos níveis de renda na determinação de condições de saúde e nutrição é um fato inquestionável. Trata-se de um papel universalmente reconhecido, embo-

ra apresentando efeitos bem diferenciados em diferentes contextos ou ecossistemas de vida. Uma relação inversa entre renda e desnutrição constitui achado bastante frequente verificandose diminuição no percentual de crianças desnutridas à medida que aumenta a renda (28,29). No estudo em tela, à mesma tendência foi observada com os maiores percentuais de *deficit* estatural nos escolares sendo encontrado nas famílias de menor renda, diminuindo à medida que melhora a renda.

Na análise bivariada observouse que no Estado de Pernambuco, com exceção da idade, as demais variáveis estudadas estiveram estatisticamente associadas ao *deficit* estatural das crianças pesquisadas. Após inclusão, destas variáveis, no modelo multivariado, permaneceram significantes as variáveis: local de residência (estrato geográfico), gênero, tratamento da água de beber, *deficit* de escolaridade e renda *per capita*.

O maior *deficit* estatural encontrado no gênero masculino está de acordo com outros trabalhos realizados em escolares (19,27,30), entretanto, as explicações não têm sido, até o momento, muito conclusivas. Segundo Carvalho et al. (27) as diferenças observadas no estado

nutricional entre escolares do gênero masculino e feminino são constatações que vêm sendo consolidadas. Mais recentemente, além de fatores constitucionais e biológicos, certos comportamentos, de caráter provavelmente antropológico, como práticas alimentares, atividades físicas e cuidados diferenciados das mães podem interferir nestas diferenças. Outra hipótese pode estar relacionada ao fato de que o padrão de referência (NCHS) subestime o *déficit* de altura em meninos (30). Neste sentido, tornam-se necessárias investigações mais específicas que possam melhor explicar as diferenças observadas entre os gêneros no que se refere ao estado nutricional.

A influência das condições socioeconômicas e ambientais sobre a estatura do indivíduo vem sendo constantemente investigada. Em Americana, Estado de São Paulo, Silva (28), verificou que a classificação nutricional dos escolares piorava sob condições desfavoráveis de abastecimento de água e esgotamento sanitário. Martins et al. (31), observaram riscos 1,7 vezes maior de baixa estatura em crianças e adolescentes que não tinham acesso a água tratada quando comparadas àquelas com melhor infraestrutura de saneamento. No presente estudo constatouse que ter ou não acesso a condições sanitárias adequadas é um diferencial importante para o estado nutricional na medida em que os resultados do modelo multivariado revelaram riscos quase duas vezes maiores para os escolares que não utilizavam água de beber tratada quando comparados com aqueles que bebiam água tratada.

Tal vez um dos aspectos, mais singulares do presente estudo seja a análise entre o estado nutricional e o *déficit* de escolarização das crianças avaliadas, constatandose que as crianças com os maiores *déficits* de escolaridade foram também as que apresentaram as maiores prevalências de baixa estatura. Portanto, estes resultados sugerem que a escola pode funcionar como fator de proteção na medida em que constitui um espaço estratégico na formação de hábitos alimentares saudáveis, acesso a uma alimentação adequada, melhoria das condições nutricionais – por meio do Programa de Merenda Escolar – e, incentivo à prática de atividades físicas (18,32).

Como considerações finais, deve-se atentar para a análise dos fatores explicativos do *déficit* estatural encontrado nas crianças estudadas que permitiu, pelo modelo de regressão logística, calcular a probabilidade de que uma criança em idade escolar do Estado de Pernambuco vir a ter baixa estatura, configurando diferentes “cenários” epidemiológicos combinando diferentes fatores com diferentes graus de intensidade. Desta forma, ao controlar os fatores de risco significativos para explicar o *déficit* estatural, estima-se em 60,3% a probabilidade de que uma criança em idade escolar apresentar baixa estatura se ele reside no IR, é do gênero masculino, não utiliza tratamen-

to da água de beber, tem um *déficit* de escolaridade de 4 anos e a renda *per capita* é inferior a 0,25 do SM. Como contraponto, esta probabilidade seria de apenas 1,5% no caso de residir no IU, ser do gênero feminino, utilizar água de beber tratada, não ter *déficit* de escolaridade e a renda *per capita* ser superior a 0,5 do SM, o que traduz uma probabilidade menor do que a esperada para a população tomada como referência de normalidade (NCHS), em que a chance teórica desta ocorrência seria de 2,3% (1,5).

Convém ainda ressaltar que no desenvolvimento do modelo de análise multivariada, com desdobramentos para os três grandes espaços geográficos estudados, evidenciase que os resultados obtidos para o conjunto do Estado de Pernambuco achamse decisivamente influenciados pela magnitude da ocorrência do *déficit* estatural em escolares do meio rural e pelos fatores de risco explicativos do problema neste estrato geográfico. Em outras palavras, descartandose a participação da amostra de crianças do meio rural, seria outra a prevalência do problema e seriam outros os componentes de risco implicados na sua determinação. São, portanto, duas realidades epidemiológicas bem diferentes, entre os meios urbanos (RMR e IU) e o rural (IR), seja descritivamente (segundo a prevalência), seja sob o aspecto analítico, representado pelo elenco de marcadores de risco.

## REFERENCIAS

1. WHO (World Health Organization). Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. Bull World Health Organ 1986; 64: 929-41.
2. Waterlow JC. Protein-energy malnutrition the nature and extent of the problem. Clin Nutr 1997; 16 (Suppl 1): 3-9.
3. Marcondes E. Nanismo Nutricional. In: Marcondes E, coordenador. Crescimento e Desenvolvimento: monografias médicas. São Paulo: Sarvier; 1978. (Série: Pediatria, Volume 1). p147-161. Rissin A. Estado Nutricional de Crianças Menores de Cinco Anos: uma análise epidemiológica no Brasil e, especialmente no Nordeste, como referência para a fundamentação de programas de intervenção nutricional [dissertação de mestrado]. Recife: Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP); 1997; 146p.
4. WHO (World Health Organization). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: The Organization; 1995. (Technical Report Series, 854).
5. Monteiro CA, Benício MHD'A, Freitas ICM. Melhoria em Indicadores de Saúde Associados à Pobreza no Brasil dos anos 90: descrição, causas e impacto sobre desigualdades regionais. São Paulo: Núcleo de Pesquisa Epidemiológica em Nutrição e Saúde (NUPENS) da Universidade de São Paulo; 1997. (Série: A Trajetória do Desenvolvimento Social no Brasil. Número, 1); 34p.
6. Parillón CD, Valverde V, Delgado H, Newman B. Distribución político administrativa del estado nutricional según el censo de talla de niños escolares del primer grado

- en Panama. *Arch Latinoam de Nut* 1988; 38: 42-54.
8. Chile. Ministério da Saúde. Situacion de Seguridad Alimentaria: Plan Nacional de Acción en Nutrición. [Santiago]: CONAN (Comision Nacional de Alimentación y Nutricion); 1996; 80p.
  9. Bengoa JM, Williamson RR. Planificacion y Organizacion de Programas Nacionales de Nutricion. *Bol Oficina Sanitaria Panam* 1972. p. 381-398.
  10. Ruh DL, Powert C, Rodgers B. Secular trends in social class and differences in adult leight. *Intern Journ Epid* 1991; 20: 1001-9.
  11. Valverde V, Delgado H, Flores S, Sibrian R, Palmieri M. The school as a source for food and nutrition surveillance systems in Central America and Panama. *Food Nutr Bull* 1985; 7: 32-37.
  12. OPS/OMS. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Vigilancia Alimentaria y Nutricional in las Americas. Martorell R, Habicht JP. Indicadores Nutricionales en los sistemas de vigilancia alimentaria y nutricional. (OPS. Publicación Científica n.º 516); Washington (DC); 1989
  13. Batista Filho M, Rissin A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad Saúde Pública*, 2003; 19 (Supl 1): S181-S191.
  14. Carvalho AT. Nanismo em escolares do Estado da Paraíba: uma abordagem ecológica [dissertação mestrado]. Recife: Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP); 1997; 172p.
  15. Lei DLM, Chaves SP, Lerner BR, Stefanini MLR. Retardo do crescimento físico e aproveitamento escolar em crianças do município de Osasco área metropolitana de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública* 1995; 11: 238-45.
  16. Malta DC, Goulart EMA, Costa MFFL. Estado nutricional e variáveis socioeconômicas na repetência escolar: um estudo prospectivo em crianças da primeira série em Belo Horizonte Brasil. *Cad Saúde Pública* 1998; 14: 157-64.
  17. IMIP(Instituto Materno Infantil de Pernambuco). Alimentação, Nutrição e Saúde no Estado de Pernambuco. In: Batista Filho M & Romani SAM, organizadores. Série: Publicações Científicas n.º 7 [Recife/PE]. 2002, 153 p.
  18. OPS/OMS. (Organização Panamericana da Saúde/Organização Mundial da Saúde). Escuelas Promotoras de Salud: modelo y guia para la acción. Desarrollo y Fortalecimiento de los Sistemas locales de Salud. Washington (DC): OPS/OMS.1996; 72p.
  19. Rivera F, Rivera MA, Leitão S, Carvalho A, Moura HJ, Benigna MJ, Lins ME, Santana P. A desnutrição crônica por municípios nos estudantes da primeira série do primeiro grau da sétima região educacional do Estado da Paraíba. Ver *Nutr [Pontifícia Universidade Católica de Campinas]* 1994; 7:113-31.
  20. Guerra VMCO, Oliveira AA, Souza MER, Dantas MJBL, Sá MLB, Girão MSN. Primeiro censo estadual de altura/idade dos escolares de primeira série do ensino fundamental. Fortaleza: Secretaria Estadual de Educação; 1993.
  21. Piauí. Secretaria de Educação e Cultura. Fundação de Amparo ao Estudante. Primeiro censo estadual de altura/idade dos escolares de primeira série do ensino fundamental do Estado do Piauí. Teresina: A Secretaria; 1993.
  22. Aracaju. Secretaria de Educação e Desportos, Secretaria de Saúde. Programa Nacional de Saúde Escolar. Saúde escolar: avaliação clínica e mecanismos de intervenção em alunos matriculados no ensino fundamental do município de Aracaju. Aracaju: As Secretarias; 1996.
  23. Mondini L, Monteiro CA. A coleta da altura de alunos ingressantes nas escolas de primeiro grau em um sistema de vigilância nutricional: análise dos dados antropométricos *J Pediatr [Rio de Janeiro]* 1994; 70: 273-9.
  24. Anjos LA, Castro IRR, Engstrom EM, Azevedo AMF. Crescimento e estado nutricional em amostra probabilística de escolares no Município do Rio de Janeiro, 1999. *Cad Saúde Pública [Rio de Janeiro]* 2003; 19 (Supl. 1):S171-S179
  25. Escola ACT, Buralli KO, Souza JMP. Crescimento físico de escolares de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil: um estudo caso-controle. *Cad Saúde Pública* 2001; 17: 79-87.
  26. Benício MHD'A, Monteiro CA. Desnutrição Infantil nos Municípios Brasileiros: Risco de Ocorrência. São Paulo: Núcleo de Pesquisa Epidemiológicas em Nutrição e Saúde (NUPENS) da Universidade de São Paulo; 1997; 274p.
  27. Carvalho AT, Costa MJC, Ferreira LOC, Batista Filho M. Retardo estatural em escolares na Paraíba: variações de gênero e idade nas quatro mesorregiões fisiográficas do Estado. *Rev IMIP* 1998; 12: 24-9.
  28. Silva MV. Estado nutricional de alunos matriculados em escolas públicas de tempo integral, São Paulo, Brasil. *Arch Latinoam Nutr* 1998; 48: 18-24.
  29. Lei DLM, Freitas IC, Chaves SP, Lerner BR, Stefanini MLR. Retardo do crescimento e condições sociais em escolares de Osasco, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública* 1997; 13: 277-83.
  30. Amigo HC, Bustos PM. Factores de riesgo de talla baja en escolares chilenos de zonas rurales de alta vulnerabilidad social. *Arch Latinoam Nutr* 1995; 45: 97-101.
  31. Martins IS, Fischer FM, Oliveira DC, Teixeira LR, Costa LAR, Marinho SP, Perestrelo JPP, Latorre MRDO, Costa LA. Crescimento e trabalho de estudantes de ensino fundamental e médio em São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 2002;36: 19-
  32. Silva MV. A trajetória do Programa de merenda escolar (1954-1994) e o estado nutricional de crianças brasileiras. *Cad de Nutrição* 1996; 11: 31-49.

Recibido: 05-10-2004

Aceptado: 03-08-2005

## Effect of the diuretic furosemide on urinary essential nutrient loss and on body stores in growing rats

*Yelitza Berné, Diamela Carías, Anna M. Cioccia, Eduardo González, Patricio Hevia*

Laboratorio de Nutrición. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

**SUMMARY.** Studies using a model of non-infectious diarrhea, have shown that increasing fecal mass by using laxatives resulted in greater fecal losses of nutrients and lower intestinal absorption. In the present study we used a diuretic to determine if increasing urine volume could result in greater urinary losses of essential nutrients. This is a relevant question because diuretics are widely and successfully used in the treatment of diseases associated with water retention and hypertension. They are known to increase potassium losses. However, there is less information on the effect of diuretics on the urinary losses of essential nutrients. Accordingly, urinary nitrogen, phosphorous, sodium, potassium, magnesium, zinc and retinol were measured in young rats consuming increasing concentrations of furosemide (0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/g diet) in the diet over 15 days. The results showed that dietary furosemide caused a dose-dependent polyuria. In addition it reduced food intake and feed efficiency and led to poor growth and greater urinary losses of all the measured nutrients and electrolytes. These losses were proportional to urine volume and represented an important fraction of the rats daily intake. The losses were negatively associated with the body and liver content of the same electrolytes and nutrients. In general, this study showed that the diuretic furosemide caused malnutrition in a short period of time by reducing food intake as well as the capacity of retaining macro and micronutrients including the liposoluble vitamin A in a relatively short period of time. This study, together with our previous studies on diarrhea, indicate that proper nutrient utilization requires both an adequate intestinal and renal function.

**Key words:** Furosemide, growth, urine losses, tissue reserves, macro and micronutrients, electrolytes.

**RESUMEN.** Efecto del diuretico furosemida sobre las pérdidas de nutrientes esenciales en orina y en las reservas corporales de ratas en crecimiento. Estudios previos en un modelo no infeccioso de diarrea, mostraron que un aumento en la masa fecal producido con laxantes aumenta las pérdidas de nutrientes en las heces y en consecuencia reduce su absorción. En el presente estudio se usó un diurético para determinar si un aumento en el volumen de orina podría tener un efecto similar pero en la retención de los nutrientes. Esta interrogante es válida ya que los diuréticos se han utilizado ampliamente y con éxito en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión y edemas y se sabe que producen deficiencias de potasio. Sin embargo, se desconoce su efecto sobre las pérdidas urinarias de nutrientes esenciales. En consecuencia, se midieron las pérdidas urinarias de nitrógeno, fósforo, sodio, potasio, magnesio, cinc y retinol en ratas en crecimiento que consumieron concentraciones crecientes de furosemida en la dieta (0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/g de dieta) durante 15 días. Se observó que la inclusión de furosemida en la dieta causó poliuria así como una reducción en el consumo, la eficiencia del alimento, el crecimiento y aumentó las pérdidas urinarias de todos los electrolitos y nutrientes estudiados. La magnitud de estas pérdidas fue proporcional al volumen de orina, representó una fracción importante de su consumo diario y afectó negativamente a las reservas tisulares de los mismos. En general, este estudio mostró que la administración del diurético furosemida causó una desnutrición asociada con una reducción en el consumo de alimento y una disminución en la capacidad de retener el nitrógeno así como algunos micronutrientes esenciales incluyendo a la vitamina A en un tiempo corto. Estas observaciones en conjunto con nuestros estudios en diarrea indican que para lograr una utilización adecuada de los nutrientes dietarios, se requiere tanto de una apropiada función intestinal como renal.

**Palabras clave:** Furosemida, crecimiento, pérdidas urinarias, reservas tisulares, macro y micronutrientes, electrolitos.

### INTRODUCTION

The concept of the biological value of dietary protein proposed by Mitchell in 1923 (1) indicates that protein utilization depends on how much of the protein consumed is absorbed and retained by the organism. Absorption and retention are determined by comparing protein intake with the amount of protein lost in the feces and in urine respectively.

This concept, which was developed for the evaluation of protein quality, can be extended to almost all nutrients. The exception are dietary fat as well as a small group of nutrients whose main route of excretion is the bile secreted by the liver. Therefore, the utilization of the majority of the essential nutrients requires not only proper intestinal function to assure absorption but also proper kidney function to assure nutrient retention.

Previous studies (2-7) have shown that altering intestinal function by using diarrhea-causing laxatives resulted in a substantial reduction in the absorption of several dietary nutrients. This reduction was mainly associated with a decrease in transit time (7) and was proportional to fecal mass or the severity of diarrhea. Since one of the functions of the kidney is to reabsorb nutrients present in the glomerular filtrate back into the circulating blood, we arrived at the following possibility: if diarrhea induced by laxatives causes malabsorption in the intestine, thus increasing urine volume or causing diuresis, then diuretics may also cause a reduction of nutrient reabsorption in the nephron tubules. Therefore, diuresis may be associated with increased urinary losses of nutrients and consequently with reduced nutrient retention and lower tissue reserves.

In order to test this hypothesis, we employed a diuretic. We measured its effect on urinary loss of nutrients and on the nutritional status of rats. This model is relevant to nutrition both in health and disease since diuretics have been successfully used in the treatment of various pathologies associated with liquid retention (8) and hypertension (9). Moreover, their utilization has recently increased because they are extensively used as part of extreme and unhealthy weight-loss practices among overweight adolescents (10) and adults (11), as well as in sports in which thinness is considered advantageous (12-13).

The main side effect of diuretics is urinary electrolyte loss (14). However, in patients using diuretics, potassium loss is the main concern because of the severe health problems this occasions (15). Despite the emphasis placed on potassium, diuretics also increase the urinary losses of other water-soluble essential nutrients and metabolites such as calcium, magnesium, chloride, bicarbonate, vitamin C, B<sub>6</sub> and thiamin (14,16-22). This indicates that individuals using diuretics may be at risk of developing nutritional deficiencies. In contrast to potassium, these deficiencies may be asymptomatic in the short term. Diuretics are prescribed for use over very long periods of time. Therefore, if nutrient losses are not prevented, they may eventually jeopardize the nutritional status of those using them. This is important because several micronutrients have been associated with the prevention of hypertension (23) which is one of the diseases diuretics are prescribed for.

Therefore, the objective of this study was to determine two things: the effect of the diuretic furosemide on urinary losses of essential nutrients, and the consequences of administering this diuretic on the nutritional status of growing rats. Accordingly, we measured several nutrients and electrolytes in the urine of young rats. These were fed diets providing all the essential nutrients and increasing concentrations of the loop diuretic furosemide. In addition to several urinary cations and phosphate, also measured was the effect of the diuretic on the urinary loss of nitrogen and retinol. Urinary nitrogen loss was included because it is representative

of protein catabolism, urinary loss of intact proteins and other nitrogen containing-metabolites. Retinol was included since increased urinary loss of retinol has been reported in children with infection and diarrhea (24).

In order to get an idea of the importance of the measured nutrient and electrolyte urinary losses, these were compared with the daily intake of the lost elements. Also, we assessed the effect of these losses on the nutritional status of the rats receiving the diuretic by measuring growth as well as lost electrolytes and essential nutrients in the rats' carcasses and livers. Those which grew less and/or featured lower reserves of these compounds in their carcasses and livers than rats which did not receive the diuretic, were considered malnourished.

## MATERIALS AND METHODS

Growing Sprague-Dawley female rats (approximately 6 weeks old) were fed a control diet (25) containing Isolated Soybean Protein 15%, Corn oil 5%, AIN 93G Mineral Mix 3.5%, AIN 93Vx Vitamin Mix 1%, Choline Bitartrate 0.2%, Methionine 0.3%, Corn Starch 50% and Sucrose 25% for four days. Then they were randomly assigned to four groups (6 rats/group). A control group received the same diet. The three other groups also received this diet, but with part of the corn starch replaced by ground furosemide-containing tablets (Lasix™ Hoechst) to provide 0.5, 1.0 and 1.5 mg furosemide/g diets. Each tablet provided 40 mg furosemide and weighed 160 mg. Therefore the amount of corn starch replaced by the ground furosemide tablets in these diets was 200, 400 and 600 mg per 100g of diet, respectively. All the diets were prepared in our laboratory using commercial ingredients. The soybean protein was purchased from Protein Technologies International of Saint Louis MO. The mineral and vitamin mixes as well as the methionine, and choline bitartrate was purchased from Harlan/Teklad, from Indianapolis IN. The corn starch, sucrose and soybean oil were obtained from local sources. The four groups of rats were placed in hanging wire stainless steel metabolic cages and were offered their assigned diets and water ad libitum for 15 days. During this period of time body weight, food, and water intake were measured every other day. Twenty-four-hour urine collections were performed on days 1,4,8,12 and 15. After measuring urine volume, a sample of the urine was stored frozen until analyzed. The rats were killed under ether anesthesia by decapitation on last day of the experiment. Blood samples were collected, the livers were dissected and the remaining carcasses were dried in a convection oven at 105 °C until constant weight. Serum was separated by centrifugation and all tissues were kept frozen at -20°C until analyzed. All animal procedures conformed to the standard principles in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (26).

In the dried rat carcasses, body nitrogen was determined using the colorimetric method of Hevia and Cioccia (27). Body protein was estimated as body nitrogen x 6.25. Body lipids were determined by the method of Blight and Dyer (28). Body ash was obtained by incineration in a Thermolyne Bench Top Furnace Muffle at 550°C. Then the ashes were diluted. Body magnesium and zinc were determined by flame ionization atomic absorption in a Perkin Elmer 2380 apparatus. Sodium and potassium were determined by emission (29). Body phosphorous was determined after acid digestion of the carcasses using Bartlett's method. (30). Liver vitamin E and vitamin A were determined by HPLC after saponification and extraction using the procedure recommended by Ueda and Igarashi (31). The same vitamins were also measured in the serum by HPLC in the manner described by Chow and Omaye (32). Urinary vitamin A was determined by HPLC as described by Alvarez et al. (24). Urinary losses of magnesium, zinc, sodium, potassium, phosphorous and nitrogen were determined directly in the urine samples using the methods just described.

Growth was determined by subtracting the initial from the final weight of each rat. Feed efficiency was calculated as: (weight gained / food consumed) x 100.

The data were analyzed using analysis of variance, correlation and regression (33). Duncan's multiple range method (34) was used as a posteriori comparison of the means. For all these analyses, the level of significance was set at 5%. The BMDP statistical package version 7.0 (35) was used in all calculations.

## RESULTS

Table 1 shows that the inclusion of furosemide in the diet of the rats caused a substantial increase in urine volume, proportional to the intake of this diuretic ( $y = 0.99x + 37.98$ ,  $r = 0.86$ ,  $p < 0.01$ ). The administration of the diuretic also caused a reduction in growth. This was associated with lower food intake and a severe decrease in feed efficiency.

Figure 1 shows that increased urine volume, caused by the administration of increasing concentrations of furosemide, was associated with elevations in urinary excretion of nitrogen, magnesium and retinol. The urinary excretion of these nutrients was proportional to urine volume. However, in accordance with the shape of the regression lines, the largest increment in nutrient excretion occurred in the first segments of the curve. This corresponded to urine volumes lower than 5 ml/24 hr and to dietary furosemide concentrations in the range of the 0.5 mg/g diet. It also corresponded to approximately 34 mg/kg body weight per day. The footnotes accompanying Figure 1 show equations for the regression lines explaining the effect of urine volume on the urinary losses of phosphorous, zinc, sodium and potassium in the same rats. The regression lines

calculated for these minerals were similar to those shown for urinary nitrogen, magnesium and retinol in the figure. The slopes of these regression lines indicate that the effect of urine volume on nutrient excretion was more apparent in the case of magnesium, phosphorous and nitrogen than in the case of zinc, sodium, potassium and retinol. Relationships similar to those shown in Figure 1 and its footnotes were also found when dietary furosemide concentration or furosemide intake was used instead of urine volume as the independent variable. Also, the results showed that the diuretic caused an increase in plasma vitamin A and vitamin E. This increment was also proportional to urine volume. The relationship between urine volume (x) and plasma vitamin A (y) was explained by the straight line  $y = 0.019x + 13.19$  ( $r = 0.60$ ,  $p < 0.01$ ). The same relationship for vitamin E was  $y = 0.94x + 296.6$  ( $r = 0.35$ ,  $p < 0.01$ ).

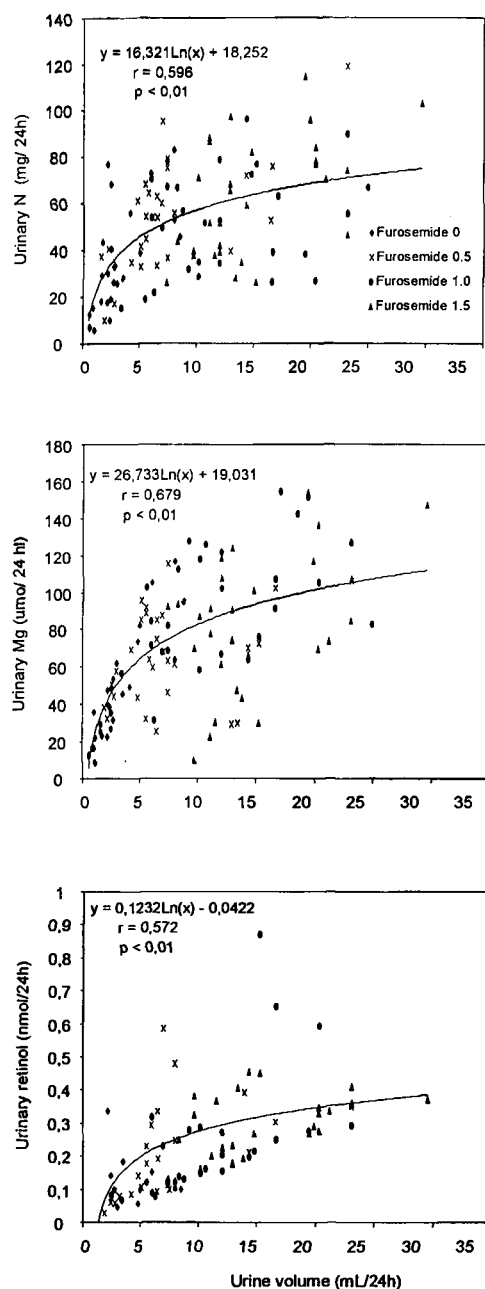
TABLE 1  
Furosemide intake, food intake, feed efficiency, growth and urine volume in rats fed diets with increasing concentrations of furosemide for 15 days<sup>1</sup>

	Dietary Furosemide concentration (mg/g diet)			
	0	0.5	1.0	1.5
Furosemide Intake (mg/15d)	0 <sup>a</sup>	84.5±3.0 <sup>b</sup>	163.4±12.5 <sup>c</sup>	226.5±27.5 <sup>d</sup>
Food intake (g/15d)	183.7±23.7 <sup>a</sup>	165.4±7.5 <sup>ab</sup>	161.2±12.3 <sup>b</sup>	151.2±18.2 <sup>b</sup>
Initial weight (g/15d)	128.2±18.05 <sup>a</sup>	128.3±19.22 <sup>a</sup>	127.7±13.31 <sup>a</sup>	128.0±12.88 <sup>a</sup>
Final weight (g/15d)	180.1±18.21 <sup>a</sup>	166.4±18.88 <sup>b</sup>	162.3±14.66 <sup>b</sup>	150.7±20.3 <sup>c</sup>
Feed efficiency (%)	51.9±8.6 <sup>a</sup>	38.1±9.78 <sup>b</sup>	34.6±4.0 <sup>b</sup>	22.7±8.0 <sup>c</sup>
Urine volume (mL/15d)	28.6±5.8 <sup>a</sup>	21.9±7.3 <sup>b</sup>	20.5±2.1 <sup>b</sup>	12.6±5.6 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Data are mean ± SD for 6 rats per group. Within a row, values with different superscripts differ significantly,  $p < 0.05$ .

Table 2 shows the fraction of the nutrient consumed which was lost in the urine of rats receiving increasing concentrations of furosemide in the diet. The percentage of the minerals and retinol consumed that was lost in the urine of the rats receiving the diuretic was higher than the loss seen in the control rats. The magnitude of these amounts varied with the nutrients. However in general terms, with the exception of phosphorous which increased approximately six times, the administration of furosemide was associated with a doubling in the fraction of the nutrient consumed that was lost in the urine.

FIGURE 1



Relationship between urine volume (x) and urinary nitrogen, magnesium or retinol (y) in rats receiving increasing concentration of furosemide in the diet.

The figure shows the results of 5 individual urine collections performed on days 1, 4, 8, 12 and 15 of the experiment of each rat in each the four furosemide concentrations used (0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg/g diet). Similar relationships were found for urinary phosphorous expressed in  $\mu\text{mol}$  ( $y = 21.76\text{Ln } x - 4.08$   $r = 0.56$   $p < 0.01$ ), urinary zinc expressed in  $\mu\text{mol}$  ( $y = 0.18\text{Ln } x + 0.44$ ;  $r = 0.45$ ;  $p < 0.01$ ), urinary sodium expressed in mmol ( $y = 0.18\text{Ln } x + 0.43$   $r = 0.60$   $p < 0.01$ ) and urinary potassium expressed in mmol ( $y = 0.14 \text{Ln } x + 0.33$   $r = 0.68$   $p < 0.01$ ).

TABLE 2

Percent of the nutrient and electrolyte consumed that was excreted in a 24 h urine sample of rats receiving increasing concentrations of dietary furosemide <sup>1</sup>

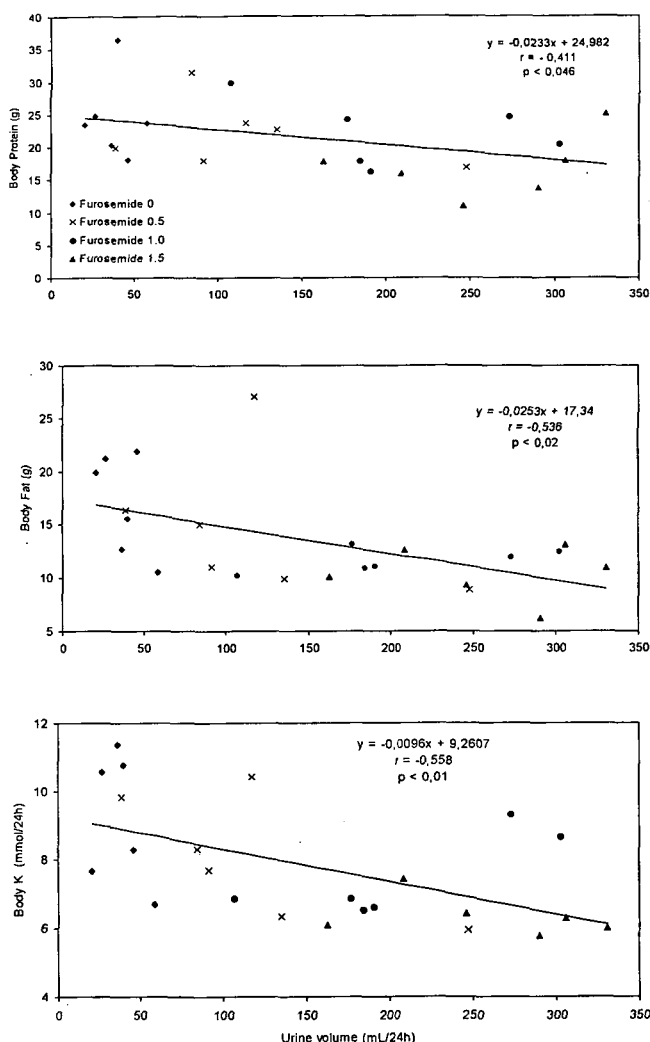
	Dietary Furosemide concentration (mg/g diet)			
	0	0.5	1.0	1.5
K	54.6 ± 21.9 <sup>a</sup>	78.1 ± 11.3 <sup>bc</sup>	85.1 ± 10.3 <sup>c</sup>	67.6 ± 6.9 <sup>ab</sup>
Na	42.3 ± 17.9 <sup>a</sup>	73.0 ± 9.7 <sup>b</sup>	66.2 ± 10.1 <sup>b</sup>	75.1 ± 7.42 <sup>b</sup>
Mg	14.7 ± 6.1 <sup>a</sup>	22.4 ± 3.5 <sup>a</sup>	38.2 ± 9.8 <sup>b</sup>	32.6 ± 5.6 <sup>b</sup>
N	11.7 ± 7.2 <sup>a</sup>	21.3 ± 6.6 <sup>b</sup>	20.3 ± 4.3 <sup>b</sup>	26.3 ± 5.9 <sup>b</sup>
Zn	10.0 ± 3.4 <sup>a</sup>	13.6 ± 1.9 <sup>ab</sup>	16.1 ± 3.0 <sup>b</sup>	20.1 ± 3.5 <sup>c</sup>
P	0.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.8 <sup>b</sup>	6.5 ± 1.7 <sup>c</sup>	6.4 ± 1.3 <sup>c</sup>
Retinol	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>bc</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Data are mean ± SD for 6 rats per group. Within a row, values with different superscripts differ significantly,  $p < 0.05$ . For calculating the values shown in the table, the average nutrient and electrolyte consumed and excreted in the urine on days 1, 4, 8, 12 and 15 of the experiment were used.

Figure 2 shows that, the more the urine excreted the less the body content of protein, fat and potassium. Similar effects were also seen for total body ash, water and the rest of the minerals included in this study (footnotes Figure 2). In the majority of these cases, even though the relationship between body content and urine volume had negative slopes and negative correlation coefficients, they did not reach statistical significance. The footnotes of Figure 2 also show that total liver vitamin E and A showed tendencies to decrease in response to increase in daily urinary output.

The results described here derive from urine collected every 24 hours for each rat on days 1, 4, 8, 12 and 15. A correlation analysis including urine volume, urinary nutrient losses and experimental time showed that neither diuresis nor nutrient losses exhibited a significant tendencies to change over time.

FIGURE 2



Relationship between urine volume (x) and total body protein, total body fat or total body potassium (y) in rats receiving increasing concentrations of furosemide in the diet.

The figure shows the body content of protein, fat and potassium of the studied rats after receiving the four furosemide concentrations (mg/g diet) used in the study for 15 days. Similar relationships were found for total body ash, water, Mg, P, Na, K and total body Zn. With exception of total body Zn ( $y = -0.03x + 58.61$   $r = -0.42$   $p < 0.05$ ), the rest also featured negative correlation coefficients. However, these did not reach statistical significance. Significant relationship between urine volume and liver vitamin E expressed in nmol ( $y = -0.32x + 145.3$   $r = -0.49$   $p < 0.05$ ) with liver retinol, also in nmol ( $y = -1.73x + 936.9$   $r = -0.43$   $p < 0.057$ ), were found as well.

## DISCUSSION

The results of this experiment showed that the incorporation of furosemide in the diet was associated with a dose-dependent increase in urine volume. This was detected at the first urine collection and remained unchanged throughout the experiment. This has also been reported in other experiments with rats receiving similar or higher doses of furosemide (36-38). However, in this study, in accordance with Modena et al., (37), the rats receiving the diuretic grew less than the controls, indicating that the incorporation of furosemide in the diet caused malnutrition. The poor growth associated with the diuretic in this study was due to a combination of reduced food intake and a reduction in feed efficiency. Although the rats receiving the diuretic were smaller, their body composition expressed as the percentage of water, ash, lipids and carbohydrates was not different from the controls. This indicates that their lower weight was not simply related to dehydration. It appears that the diuretic, in addition to causing reduced food intake, limited the conversion of food into new tissue. One reason for this limitation could have been the increased urinary losses of the nutrients consumed. This finds support in the observation that the greater the urine volume, the less the net content of body protein and body lipids found in the furosemide-fed rats.

The administration of the diuretic was associated with increased urinary losses of all the metabolites we measured and these losses were proportional to urine volume. The nutrient that was affected the most was magnesium followed in order by phosphorous, nitrogen, sodium, zinc, potassium and the fat-soluble vitamin retinol. Examining the shape of the curves describing the relationship between urine volume and the urinary losses of all these nutrients, it became apparent that the losses occurred at all the concentrations of furosemide used. The largest effect, however, was seen at the lowest level of urine volume, which corresponded to the lowest dose of the diuretic. Also, the fact that furosemide affected all the metabolites in a somewhat similar manner suggests that its effect may be more related to the polyuria it causes rather than to its specific properties as opposed to other diuretics. This assumption agrees with the observations of Rieck et al. (20) who found furosemide-associated losses of thiamin in humans receiving low doses of this diuretic. They also are in line with the observations of Lubetsky et al. (18) who found that in rats, thiamin losses increased with furosemide, with other diuretics and also with volume load.

Comparing the nutrient and electrolyte losses associated with the administration of the diuretic with the intake of these same compounds, it is seen that the losses were important in magnitude since in most cases the diuretic almost doubled the fraction of the intake that was lost in the urine. In addition,

these increased losses had consequences, since there was a tendency for the body reserves of all the measured compounds to decrease as the urine volume and the diuretic intake increased. This indicates that individuals using diuretics may have higher nutrient requirements than those who do not. It is interesting that this may apply not only to water-soluble electrolytes and micronutrients as has been shown before (14,16-22), but also to the macronutrients and liposoluble vitamins. This is because we found increased losses of nitrogen and retinol in the urine together with a tendency for lower body protein and lipids. Also we noted a lower liver content of both vitamin A and vitamin E in the rats receiving the diuretic. Although in this study the diuretic increased urinary losses of vitamin A, this increment was much lower than the urinary retinol losses seen by Alvarez et al. (24) in infection and diarrhea.

A point that should be addressed in regard to the possible nutritional implications of furosemide is the dose of the diuretic used. The usual therapeutic dose of this diuretic in hypertensive patients falls in the range of 40mg to 240 mg once or twice a day (9) or approximately 0.61 to 7 mg/kg per day. However, patients with severe congestion of the lungs, liver, and spleen, as well as ascites, pleural effusions and peripheral edema associated with heart failure are treated with high doses of diuretics (39). Edema associated with heart failure is a problem that affects a large number of people. It is the only cardiovascular disorder that is increasing both in incidence and prevalence and it is the most common medical diagnosis for hospitalized patients aged  $\geq 65$  years (39). In these patients, the administration of 0.5 to 4g furosemide per day, for a few days to many months has been successfully used to alleviate congestion (8,39-44). These doses represent approximately 7 – 57 mg/kg body weight per day and they are in the range administered to the rats studied in this experiment, which consumed 34-103 mg/Kg/day during 15 days. High doses of furosemide (6.5 -25.5 mg/kg/day) have also been used to prevent oliguria associated with renal failure (45). A recent report of long-term furosemide abuse (46) showed that the daily dose of this diuretic ranged from 40 to 2800 mg/day or approximately 0.6 to 40 mg/kg/day. The studied subjects used this diuretic in order to control weight or edema, and they used for 3 to 28 years (46). From the previous analysis it is apparent that compared with the lowest dose used for the treatment of hypertension in humans, the rats studied here consumed from 56 to 168 times more furosemide (but for a much shorter time). However, the doses used in this study, did not greatly exceed the doses used in humans with renal or congestive heart failure or the amounts consumed by adult furosemide abusers. Therefore, the doses we administered may be used to evaluate the effect of this diuretic on nutritional status in longer-term studies.

In general, this study indicates that furosemide utilization

may result in a deterioration of nutritional status including both the macro and the micronutrients. Based on the results of this study, it appears that individuals receiving high doses of this diuretic for long periods of time should pay special attention to dietary intake of all essential nutrients. This is important because it has been observed that older patients with congestive heart failure do not fulfill their daily nutritional requirements of thiamin (17). Also, this recommendation agrees with the results of Ali and Al-Qaravi, (16) who reversed thiamin deficiency in furosemide-treated rats with thiamin supplements. The recommendation is also in line with the results of Shimon et al. (21) who found, after thiamin repletion, an improvement in left ventricular function in long-term furosemide treated patients with moderate-to-severe congestive heart failure. The results of this study suggest that not only thiamin but also the rest of the essential nutrients including the macronutrients and the fat soluble vitamins, merit careful attention.

Studies in humans and further studies with animals appear to be needed to determine what nutritional precautions need to be taken when the use of diuretics is recommended.

In general, this study, together with our studies on the effect of diarrhea on fecal nutrient losses, indicates the following: in order to maximize the utilization of dietary nutrients, adequate intestinal absorption as well proper renal reabsorption are required. This is so because diarrhea reduces nutrient absorption and high diuresis reduces nutrient retention.

## REFERENCES

1. Mitchell HH. A method for determining the biological value of protein. *J Biol Chem.* 1923;58:873-922.
2. Liuzzi JP, Cioccia AM, Hevia P. In well fed young rats lactose induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamin A and E and affects preferentially vitamin E status. *J Nutr* 1998; 128: 2467-72.
3. Hevia P, Carías D, Cioccia AM, González E. Diarrea y Nutrición: experiencia en niños y ratas. *An Venez Nutr* 1998; 11: 28-36.
4. Carías D, Cioccia AM, Hevia P, Romer H, Guerra M, Brito, O. Utilización de Nutrientes en niños con diarrea aguda alimentados con fórmula a base de pollo y de soya. *Arch Latinoamer Nutr* 1999; 49: 130-7.
5. Arciniegas EL, Cioccia AM, Hevia P. Efecto de la diarrea inducida con lactosa sobre la disponibilidad de los macronutrientes y la función inmune en ratas nutridas y desnutridas. *Arch Latinoamer Nutr* 2000;50:48-54.
6. González E, Sánchez G, Cioccia AM, Hevia P. Absorción de grasa proveniente de tres fuentes dietarias en ratas con diarrea inducida con lactosa. *Arch Latinoamer Nutr* 2001;51:244-49.
7. De Lima M, González E, Cioccia AM, Hevia P. Efecto de la diarrea osmótica y secretora sobre la función y morfología del intestino en ratas. *Arch Latinoamer Nutr* 2002;52:20-8.
8. Rasool A, Palevsky PM. Treatment of edematous disorders with diuretics. *Am J Med Sci* 2000; 319:25-37.

9. Puschett JB. Diuretics and the therapy of hypertension. *Am J Med Sci* 2000; 319:1-9.
10. Neumark-Sztainer D, Story M, Hannan PJ, Perry CL, Irving LM. Weight-related concerns and behaviors among overweight and nonoverweight adolescents: implications for preventing weight-related disorders. *Arch Ped Adol Med* 2000;156:171-8.
11. Serdula MK, Collins ME, Williamson DF, Anda RF, Pamuk E, Byers TE. Weight control practices of U.S. adolescents and adults. *An Inter Med* 1993 ;119:667-71.
12. DePalma MT, Koszewski WM, Case JG, Barile RJ, DePalma BF, Oliaro SM. Weight control practices of lightweight football players. *Medical Science Sports and Exercise* 1993;25:694-701.
13. Moore JM, Timperio AF, Crawford DA, Burns CM, Cameron-Smith D. Weight management and weight loss strategies of professional jockeys. *International Journal of Sport Nutrition Exercise and Metabolism* 2002;12:1-13.
14. Greenberg A. Diuretic complications. *Am J Med Sci* 2000; 319:10-24.
15. Escott-Stump S, Hypokalemia. In: *Nutrition and Diagnosis Related Care*. Maryland :Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
16. Ali BH, Al-Qarawi AA. Thiamin status in furosemide-treated rats. *Pharmacology Research* 2000; 42: 21-4.
17. Brady JA, Rock CL, Horneffer MR. Thiamin status, diuretic medication, and the management of congestive heart failure. *Journal of the American Dietetic Association* 1995;95:541-44.
18. Lubetsky A , Winaver J, Seligmann H, Olchovsky D, Almog S, Halkin H, Ezra D. Urinary thiamine excretion in the rat: effects of furosemide, other diuretics and volume load. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1999; 134:232-7.
19. Mydlik M, Derzsiova K, Zemberova E. Influence of water and sodium diuresis on furosemide on urinary excretion of vitamin B6, oxalic acid and vitamin C in chronic renal failure. *Mineral Electrolyte Metabolism* 1999; 25:352-6.
20. Rieck J, Halkin H, Almog S, Seligman H, Lubetsky A, Olchovsky D, Ezra D. Urinary loss of thiamin is increased by low doses of furosemide in healthy volunteers. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1999; 34: 238-43.
21. Shimon I, Almog S, Vered Z, Seligman H, Shefi M, Peleg E, Rosenthal T, Motro M, Halkin H, Ezra D. Improved left ventricular function after thiamine supplementation in patients with congestive heart failure receiving long-term furosemide therapy. *American Journal of Medicine* 1995;98:485-90.
22. Suter PM, Haller J, Hany A, Vetter W. Diuretic use: a risk for subclinical thiamine deficiency in elderly patients. *Journal of Nutrition Health and Aging* 2000; 4: 69-71.
23. Krishnamurty D, Shyamala D. Blood pressure regulation and micronutrients. *Nutrition Research Reviews* 2001;14:3-43.
24. Alvarez J, Salazar E, Kohatsu J, Miranda P., Stephensen Ch B. Urinary excretion of retinol in children with acute diarrhea. *Am J Clin Nutr* 1995; 6:1273-76.
25. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1993;107:1340-48.
26. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC: National Academy Press; 1996.
27. Hevia P, Cioccia AM. Application of a colorimetric method to the determination of nitrogen in nutritional studies with rats and humans. *Nutriton Reports International* 1988;38:1129-36.
28. Blight EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 1959; 37:911-16.
29. Perkin-Elmer . *Analytical methods for Atomic Absorption Spectrophotometry*. Norwalk Connecticut; 1982.
30. Bartlett GR. Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1958; 234: 466-68.
31. Ueda T, Igarashi O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC. Pretreatment of samples and extraction of tocopherols. *Journal of Micronutrient Analysis* 1990;7:79-86.
32. Chow FI, Omaye ST. Use of antioxidants in the analysis of vitamins A and E in mammalian plasma by high performance liquid chromatography. *Lipids* 1983;18: 837-41.
33. Daniel WW. *Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud*. México: Uthea Noriega; 1999.
34. Duncan DB. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 1955;11:1-6.
35. BMDP Statistical Software Inc., *BMDP User's Guide*. Los Angeles Cal. 1993.
36. Scherzer WH, Popoptzer MM. Inhibition of thick ascending limb Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in salt-loaded rats by furosemide. *Am J Physi* 1989; 256:549-55.
37. Modena B, Holmer S , Eckardt KU , Schricker K, Riegger G, Kaissling B, Kurtz A. Furosemide stimulates renin expression in the kidneys of salt-supplemented rats. *Pflugers Archives* 1993; 424:403-9.
38. Merino A, Moreno G, Mercado A, Bobadilla NA, Gamba G. Na<sup>+</sup>(+):K<sup>+</sup>(+):ATPase mRNA expression in the kidney during adaptation to sodium intake and furosemide treatment. *Arch Medi Resear* 2000; 31: 486-92.
39. Howard PA, Dunn MI. Aggressive diuresis for sever heart failure in the elderly. *Chest* 2001;119: 807-10.
40. Kuchar DL, O'Rourke MF. High dose furosemide in refractory cardiac failure. *European Heart Journal* 1985; 11: 954-58.
41. Gerlag PG, van Meijel JJ. High-dose furosemide in the treatment of refractory congestive heart failure. *Arch Inter Med* 1988;148:286-91.
42. Dormans TP, van Meyel JJ, Gerlag PG, Tan Y, Russell FG, Smits P. Diuretic efficacy of high dose furosemide in severe heart failure: bolus injection versus continuous infusion. *Journal of the American College of Cardiology* 1996; 2: 376-82.
43. Murray MD, Deer MM, Ferguson JA, Dexter PR, Bennet SJ, Perkins SM, Smith FE, Lane KA, Adams LD, Tierney WM, Brater DC. Open-label randomized trial of torsemide compared with furosemide therapy for patients with heart failure. *Am J Med* 2001; 111: 513-20.
44. Licata G, Di Pasquale P, Parrinello G, Cardinale A, Scandurra A, Follone G, Argano C, Tuttolomondo A, Paterna S. Effect of high-dose furosemide and small-volume hypertonic saline solution infusion in comparison with a high dose of furosemide as bolus in refractory congestive Herat failure: long-term effects. *Am Heart J* 2003; 145: 459-66.
45. Prandota J. High doses of furosemide in children with acute renal failure. A preliminary retrospective study. *International Urology and Nephrology* 1991;23:383-92.
46. Kim YG, Kim B, Kim MK, Chung SJ, Han HJ, Ryu JA, Lee YH, Lee KB, Lee JY, Huh W, Oh HY. Medullary nephrocalcinosis associated with long-term furosemide abuse in adults. *Nephrology Dialysis Transplant* 2001;16:2303-9.

Recibido:12-02-2005

Aceptado: 17-05-2005

## Identificación de *Enterococcus sp.* en muestras de leche cruda del Area Metropolitana de Costa Rica y evaluación del patrón de sensibilidad a antibióticos

Melania Araya, Gabriela Davidovich, Carolina Chaves y María Laura Arias

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales. Costa Rica

**RESUMEN.** Se aislaron e identificaron bacterias del género *Enterococcus sp.* a partir de muestras de leche no pasteurizada del Gran Área Metropolitana costarricense, con el propósito de evaluar su patrón de sensibilidad a antibióticos de uso común. Se recolectaron 105 muestras de leche de proveedores de una industria lechera nacional y se realizó el aislamiento inicial de las bacterias en el medio de cultivo EVA (Ethyl Violet Agar). Las colonias que crecieron, fueron inicialmente caracterizadas fenotípicamente por medio de pruebas bioquímicas, la identificación a nivel de especie se realizó utilizando el sistema API 20 Strep. A las distintas especies de *Enterococcus sp.* se les realizó pruebas de sensibilidad a diversos antibióticos utilizando el método de difusión en placa, la Concentración Mínima Inhibitoria a vancomicina fue determinada por medio del E-test. Del total de muestras de leche analizadas, un 38% fueron positivas para *Enterococcus sp.*; se aislaron 48 cepas diferentes en donde se encontró un predominio de *E. faecalis* y *E. faecium* (71% y 19% respectivamente); además de *E. durans* (4%), *E. gallinarum* (4%) y *E. avium* (2%). El análisis de distribución geográfica de los aislamientos no indicó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la procedencia de las muestras positivas por *Enterococcus sp.* Todas las bacterias identificadas mostraron una resistencia importante a los antibióticos probados. La familia de los aminoglicósidos resultó ser la menos eficiente para limitar el crecimiento de estas bacterias. La resistencia a eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol fue menor al 50% y las bacterias fueron sensibles a la bacitracina. Se encontró un 8% de resistencia a la vancomicina. No se encontró relación entre los porcentajes de resistencia y las distintas provincias analizadas. Es importante resaltar que las especies resistentes a vancomicina provenían de Cartago, una de las provincias con mayor producción de leche en Costa Rica. **Palabras clave:** *Enterococcus sp.*, resistencia a antibióticos, leche no pasteurizada.

**SUMMARY.** Identification of *Enterococcus sp.* isolated from raw milk samples coming from the Metropolitan Area of Costa Rica and evaluation of its antibiotic sensibility pattern. Bacteria from the genus *Enterococcus sp.* were isolated and identified from non-pasteurized milk samples obtained from the Costa Rican Metropolitan Area, in order to evaluate its sensitivity pattern to common use antibiotics. One hundred five milk samples were collected from suppliers of a national dairy industry. The initial isolation was done in EVA (Ethyl violet agar). Isolated colonies were initially characterized phenotypically as *Enterococcus sp.* using biochemical tests, species' identification was done using the Api 20 Strep kit. The different *Enterococci* species were tested for their antibiotic sensitivity using the plate diffusion method; the minimal inhibition concentration (MIC) to vancomycin was determined using E test. 38% of the milk samples were positive for *Enterococcus*; 48 different strains were isolated, where *E. faecalis* corresponded to 71%, *E. faecium* to 19%, *E. durans* to 4%, *E. gallinarum* to 4% and *E. avium* to 2%. The geographical distribution analysis of the species isolated did not show significant statistical differences according to the origin of the samples. All isolates identified showed an important resistance rate to the antibiotics tested. The aminoglycoside family showed the lower resistance rate, the resistance to eritromycin, tetracycline and chloranphenicol was lower than 50% and all strains were sensitive to bacitracin. An 8% resistance rate to vancomycin was determined. No relationship between the resistance rate of samples and the province of origin was found, but it is important to emphasize that the strains resistant to vancomycin came from Cartago, one of the Costa Rican regions with highest milk production.

**Key words:** *Enterococcus sp.*, antibiotics resistance, non-pasteurized milk

### INTRODUCCION

El uso de los agentes antimicrobianos en la terapéutica de las enfermedades infecciosas ha constituido un acontecimiento sin precedentes. La cura y control de las infecciones permitió modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad del adulto, en el que estas afecciones ocupan el

primer lugar entre las causas de muerte. En la actualidad se calcula que aproximadamente el 40% de todos los pacientes hospitalizados reciben tratamiento con antimicrobianos; sin embargo, su amplio uso fomenta el aumento de la resistencia de los microorganismos, lo que crea una necesidad cada vez mayor de nuevas drogas y encarece el tratamiento (1).

Los antibióticos son utilizados en los animales para

prevenir y tratar las infecciones; pero también se utilizan con frecuencia en dosis subterapéuticas para promover el crecimiento, incrementando el aumento de peso y mejorando la utilización del alimento. Dentro de los antibióticos utilizados, ya sea como promotores de crecimiento o profilaxis, se incluyen agentes aprobados y no aprobados; aminoglicósidos (gentamicina, kanamicina, neomicina y estreptomycin), bacitracina, cloranfenicol, glicopéptidos (vancomicina), macrólidos (eritromicina), oligosacáridos y tetraciclina. Muchos de estos antibióticos, por ejemplo glicopéptidos como la vancomicina, pueden inducir la selección y amplificación de patógenos resistentes y dentro de ellos, se incluyen a bacterias como los enterococos. Estos microorganismos potencialmente resistentes pueden transmitirse a los seres humanos a través de las cadenas alimenticias y podrían causar enfermedades en las circunstancias apropiadas (2).

Dada la información anterior, es claro que los enterococos que habitan reservorios no humanos juegan un papel crítico en la adquisición y diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos. De manera que el monitoreo de cepas resistentes en agricultura, ganadería y clínica es de suma importancia para preservar el valor terapéutico de los antimicrobianos (3).

En Costa Rica se consumen 451 millones de litros de leche al año, proveniente principalmente de ganado vacuno. El 50% de la leche se industrializa y el otro 50% se consume fresca (leche cruda) (4). La leche contiene microorganismos de importancia en Salud Pública, entre los que se destacan *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Estas bacterias son resistentes al calor y poseen la característica de sobrevivir los procesos de pasteurización de la leche (5) y aún cuando estrictamente no son patógenos que se transmitan con los alimentos; el ganado puede servir como reservorio de cepas de enterococos resistentes a antibióticos, que eventualmente pueden ingresar a las cadenas alimenticias humanas, lo cual ha hecho que se reconozcan como las principales bacterias causantes de infecciones intrahospitalarias severas (6).

En Costa Rica, existen muy pocos trabajos relacionados con el aislamiento de *Enterococcus sp.* a partir de leche cruda y/o la descripción de su patrón de sensibilidad a antibióticos. En vista de esto se desarrolló este proyecto, considerando el amplio consumo de leche en el ámbito nacional y su actual importancia como producto de exportación.

## MATERIAL Y METODOS

### Recolección de muestras

Se obtuvieron 105 muestras de leche no pasteurizada de proveedores de una industria lechera nacional. Todas las muestras se obtuvieron por ordeño automático. Se

transportaron en frío al Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología, donde se analizaron en menos de 4 horas después de su recolección.

### Aislamiento inicial

Se siguió la metodología descrita en el "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food" (5), para el aislamiento de *Enterococcus sp.* Se rayó una asada de cada muestra de leche en agar EVA (Ethyl Violet Agar). Las placas se incubaron por 48 horas a 44.5°C, con el fin de aumentar la selectividad.

### Caracterización fenotípica

Las colonias que crecieron en el agar EVA se evaluaron por: tinción de Gram (cocos gram positivos), catalasa (negativa), crecimiento en CTS con 6.5% de NaCl (positivo) y crecimiento en presencia de bilis con reducción de la esculina (positivo).

### Identificación a nivel de especie

Las cepas aisladas fueron identificadas utilizando el sistema API 20 Strep.

### Determinación del patrón de sensibilidad a antibióticos

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos se realizaron de acuerdo al procedimiento de difusión en placa, descrito por Kirby y Bauer, tomado del Manual de Microbiología Clínica de la ASM (7). Este procedimiento está aprobado por The National Comitee for Clinical Laboratory Standards (8).

De acuerdo a esto, se hizo una suspensión en solución salina estéril 0.85% ajustado al 0.5 de la escala de McFarland, a partir de cultivos frescos en placas de ATS de los aislamientos previamente identificados. En un lapso no mayor a 15 minutos de ajustado el inóculo, se introdujo un hisopo de algodón, se le eliminó el exceso de líquido y se distribuyó en la superficie de dos placas de agar Müeller- Hinton, rayando en tres direcciones, rotando la placa aproximadamente 60° entre cada una, para asegurar una distribución uniforme. En un lapso no mayor a 15 minutos, se aplicaron los discos de antibióticos (gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomycin, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina) utilizando pinzas estériles.

Se incubaron las placas a 35°C por 18 a 20 horas. Pasado este tiempo, se midió el diámetro de inhibición alrededor del disco de antibiótico.

En cuanto a la interpretación de los halos de inhibición para neomicina y bacitracina, no se encontraron tablas de referencia para la evaluación de sensibilidad o resistencia debido a que su uso no requiere de prueba de sensibilidad. Se utilizaron los valores planteados por la NCCLS para otros antibióticos de estas familias (aminoglicósido y polipéptido).

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de vancomicina: E-test

Esta prueba se realizó siguiendo la metodología descrita por el Departamento de Microbiología del Hospital Mount Sinai, en su Manual para Pruebas de Susceptibilidad. Según el método, se preparó una suspensión de la cepa a analizar en solución salina 0.85% que fuera equivalente al 0.5 de la escala de McFarland y que proviniera de cultivos frescos (24 horas) en placas de ATS. En un lapso no mayor a 15 minutos de ajustado el inóculo, se introdujo un hisopo de algodón, se le eliminó el exceso de líquido y se distribuyó en la superficie de una placa de agar Müeller- Hinton, rayando en tres direcciones, rotando la placa aproximadamente 60° entre cada una, para asegurar una distribución uniforme. En un lapso no mayor a 15 minutos, se aplicaron con pinzas estériles las tiras de E-test con vancomicina.

Se incubaron las placas a 35°C por 24 horas. Pasado este tiempo, se leyó el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria en el punto de intersección entre la elipse de inhibición y el borde de la tira.

Como control de calidad se utilizó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, con una concentración mínima inhibitoria de 1-4 µg/mL y también se probó la cepa de *E. faecalis* ATCC 51299 (van A+) encontrándose el patrón de resistencia esperado.

### Análisis estadístico

Se utilizaron los programas de cómputo Excell y SPSS para realizar el estudio estadístico de los datos obtenidos.

## RESULTADOS

### Aislamiento e identificación

De las 105 muestras de leche cruda provenientes del Gran Área Metropolitana que fueron analizadas, 40 fueron positivas por enterococos, lo cual corresponde a un 38% del total. Se aislaron 48 cepas diferentes puesto que 8 de las muestras de leche analizadas (20%) tenían más de una de estas bacterias.

En la Tabla 1 se presenta la identificación de las especies aisladas. La mayoría correspondieron a *Enterococcus faecalis*, un menor porcentaje a *Enterococcus faecium* y unas pocas a *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus avium*.

En cuanto a la distribución geográfica de los aislamientos, se tiene que del total de muestras analizadas de la provincia de Heredia, un 67% fueron positivas por *Enterococcus sp.* En el resto de las regiones estudiadas se obtuvieron porcentajes de positividad mucho menores; así, en Cartago se observó un 43% y en San José y Alajuela los resultados fueron muy similares, 33% y 32% respectivamente. La Tabla 2 presenta la distribución de las cepas aisladas según la provincia de origen.

TABLA 1  
Número y porcentaje de cada especie de enterococos aislada de las muestras de leche cruda (n = 48)

Especie	Número de cepas	Porcentaje
<i>Enterococcus faecalis</i>	34	71%
<i>Enterococcus faecium</i>	9	19%
<i>Enterococcus durans</i>	2	4%
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	4%
<i>Enterococcus avium</i>	1	2%

TABLA 2  
Distribución de cada una de las especies de enterococos aisladas según la provincia de origen

Especie	Alajuela	Cartago	Heredia	San José
<i>E. faecalis</i>	70%	62%	80%	100%
<i>E. faecium</i>	18%	24%	20%	0%
<i>E. durans</i>	0%	9%	0%	0%
<i>E. gallinarum</i>	6%	5%	0%	0%
<i>E. avium</i>	6%	0%	0%	0%

### Pruebas de susceptibilidad a antibióticos por difusión en placa

De los 48 aislamientos de enterococos probados por su resistencia contra 8 antibióticos, el 100% mostró algún grado de resistencia.

En la Tabla 3 se muestran los porcentajes totales de resistencia para los diferentes tipos de antibióticos en los aislamientos de *Enterococcus sp.* Las cepas con perfil de susceptibilidad a antibióticos «intermedio» de acuerdo a las normas de la NCCLS, fueron considerados como resistentes al antibiótico en cuestión. Para seis de los ocho antibióticos analizados, la resistencia superó el 50%. El porcentaje mayor se observó para la estreptomina, seguida de la neomicina, la kanamicina y la gentamicina; todas con resultados mayores al 75%. Por otro lado, en la eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol se obtuvo una resistencia entre el 25% y el 56%; mientras que las bacterias se mostraron muy susceptibles a la bacitracina presentando una resistencia del 6%.

En cuanto a las distintas especies de enterococos identificadas, se observó que un 94% de las cepas de *E. faecalis* presentaron resistencia a cuatro o más de los antibióticos analizados, condición que se considera como multiresistencia. La misma situación se encontró en el caso de *E. durans*, donde el 100% de los aislamientos fueron multiresistentes. *E. faecium* presentó porcentajes de resistencia de 11% a dos y tres antibióticos y de 78% a cuatro o más antibióticos; mientras que en las cepas de *E. gallinarum* se encontró un 50% de resistencia a dos antibióticos y un 50% de multiresistencia.

Por último, el único aislamiento de *E. avium* mostró ser resistente sólo a uno de los antibióticos utilizados (Tabla 4).

TABLA 3  
Porcentajes totales de resistencia a los antibióticos utilizados en los aislamientos de *Enterococcus sp*

Antibiótico	Número de cepas resistentes	Porcentaje de resistencia
Estreptomicina	47	98%
Neomicina	44	92%
Kanamicina	41	85%
Gentamicina	38	79%
Eritromicina	27	56%
Tetraciclina	25	52%
Cloranfenicol	12	25%
Bacitracina	3	6%

TABLA 4  
Porcentajes de resistencia de las especies de enterococos a diferentes cantidades de antibióticos

Cantidad de antibióticos	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. avium</i>
0	0%	0%	0%	0%	0%
1	0%	0%	0%	0%	100%
2	3%	11%	0%	50%	0%
3	3%	11%	0%	0%	0%
4 o más	94%	78%	100%	50%	0%

La distribución geográfica de los aislamientos muestra que en cada una de las provincias del área metropolitana analizadas, existen niveles de multirresistencia (resistencia a cuatro o más antibióticos) mayores al 80%, siendo San José la zona con un mayor nivel de multirresistencia (100%), seguida por Cartago (90%), Alajuela (82%) y Heredia (80%).

#### Concentración mínima inhibitoria de vancomicina

Según el análisis de resistencia a vancomicina en las cepas de *Enterococcus sp.*, se encontró un porcentaje total de resistencia del 8% y el resto de los aislamientos se mostraron sensibles a este antibiótico.

El 75% de las bacterias resistentes fueron *E. faecium* con una concentración mínima inhibitoria de 6 µg/mL y el 25% *E. gallinarum* con una concentración mínima inhibitoria de 8 µg/mL.

Es importante resaltar que todas las bacterias resistentes a vancomicina provenían de muestras de leche de la provincia de Cartago.

## DISCUSION

### Aislamiento e identificación

Al observar los resultados obtenidos en este estudio, se encuentra que en las muestras de leche analizadas se tiene poca presencia de *Enterococcus sp.* puesto que sólo un 38% del total se encontraban positivas. Este hecho concuerda con previos estudios en los que se establece que la prevalencia de este género en ganado de leche es infrecuente (9).

La presencia de *Enterococcus sp.* en leche puede provenir de una contaminación fecal directa o indirecta. Esta situación se puede explicar de distintas maneras, por un lado se relaciona con el ambiente del cual se obtiene este producto puesto que el ganado vacuno, por lo general mantiene una relación estrecha con otros animales de granja como gallinas, perros, caballos y cerdos. Así, estos ruminantes adquieren distintas especies de *Enterococcus sp.* que pueden llegar a encontrarse en la leche. Por otro lado, la leche también podría contaminarse directamente con materia fecal de cualquier animal de granja e incluso del ser humano. Otro mecanismo para justificar la presencia de estas bacterias en la leche se relaciona con la limpieza del equipo de ordeño y con la pureza del agua que se utiliza para el proceso.

*Enterococcus faecalis* fue la especie bacteriana que se aisló en mayor cantidad en estas muestras, constituyendo el 71% de los aislamientos. Esto concuerda con lo observado en la naturaleza, ya que esta especie es sumamente ubicua y se puede aislar de fuentes diversas como agua, animales domésticos, animales de granja y seres humanos (10). Además, el 19% de las cepas eran *E. faecium* que también se encuentra en hábitats variados, se aisló en algunas muestras junto con *E. faecalis* y se considera otro indicador importante de contaminación fecal (9).

Diversos estudios (9,11) han descrito que existen especies de enterococos que son más frecuentemente aisladas de ciertos animales, como es el caso de *E. durans* que se encuentra principalmente en cerdos, *E. avium* presente en diversos tipos de aves y *E. gallinarum* que se asocia a aves de corral como gallos, gallinas y pollos. De ahí que se encontraron estas bacterias en porcentajes menores al 5% en el tipo de muestra analizada (leche de vaca).

En cuanto a la distribución geográfica, las muestras positivas por *Enterococcus sp.* presentaron similitud en porcentajes en las provincias de Alajuela, Cartago y San José. En Heredia la positividad fue mucho mayor, duplicando los valores obtenidos en las otras provincias (67%). Esto puede deberse a que existe un mayor nivel de contaminación fecal en la leche o el equipo de ordeño en las lecherías de esta provincia. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico para comparar el porcentaje de positividad en las provincias estudiadas, se demostró que no existen diferencias en las distintas regiones.

### Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Los resultados obtenidos indican que en nuestro país es importante la incidencia de bacterias resistentes en la leche no pasteurizada puesto que todos los aislamientos presentaron resistencia a uno o más de los antibióticos analizados.

Según el análisis estadístico realizado (chi cuadrado), hay diferencias significativas en cuanto a la resistencia de las bacterias a los antibióticos probados ( $p < 0,01$ ). Esto se evidencia claramente con la observación de que hay únicamente un 6% de resistencia a bacitracina, mientras que a estreptomycin es del 98%. Cabe resaltar que para seis de los nueve antibióticos estudiados, el porcentaje de resistencia superó el 50% lo cual es sumamente relevante.

El alto grado de resistencia de los *Enterococcus sp.* en muestras de leche es un reflejo del uso indiscriminado de los antibióticos en ganadería, tanto a nivel terapéutico así como para promover el crecimiento de los animales (4,12). Además, estas observaciones evidencian la evolución que han sufrido las poblaciones bacterianas a causa de la presión de selección que ejercen estos fármacos sobre los microecosistemas naturales (13).

Debe destacarse que el grupo de los aminoglicósidos es el que presenta los mayores niveles de resistencia. Esto se debe a dos razones, la primera es que estas bacterias presentan niveles bajos de resistencia innata a estos antibióticos. Al ser anaerobias facultativas, no pueden crear el potencial de electrones necesario para que el sistema de transporte de los aminoglicósidos se active, con lo que la droga no ingresa al citoplasma y no puede ejercer su efecto. La segunda razón es el desarrollo de resistencia de alto nivel a través de mutaciones cromosómicas que impiden la unión con el sitio blanco o la adquisición de genes que codifican por enzimas que inactivan la droga (7).

Estudios previos han demostrado que la estreptomycin es el antibiótico que induce resistencia de alto nivel con mayor frecuencia (14). Esto se comprueba en este trabajo, ya que para este antibiótico el porcentaje de resistencia fue mayor que para el resto de las drogas analizadas (98%). Además, las cepas de *Enterococcus sp.* que presentan resistencia de alto nivel a estreptomycin, no necesariamente son altamente resistentes a gentamicina ni al resto de aminoglicósidos, situación que también se demostró en este proyecto, al tener porcentajes de resistencia del 79% al 92% para gentamicina y el resto de los fármacos de esta familia.

La eritromicina, la tetraciclina y el cloranfenicol poseen mecanismos de acción similares al actuar sobre el ribosoma bacteriano y en este caso, presentaron porcentajes de resistencia intermedios que oscilaron entre el 25% y el 56%.

Tanto la bacitracina como la vancomicina ejercen su acción sobre la pared bacteriana y se ha visto que los enterococos se caracterizan por ser sensibles a bajas dosis de estos antibióticos (14). De acuerdo a los resultados, la resistencia a

estos antibióticos fue únicamente del 6% y del 8% lo cual es relativamente bajo.

La problemática de una alta tasa de resistencia como la descrita anteriormente, representa un grave problema en salud pública ya que la terapia de elección para las infecciones por *Enterococcus sp.* es una combinación de un aminoglicósido junto con un glicopéptido (14).

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en la leche es de suma importancia ya que posibilita la diseminación de tales microorganismos a las personas a través de la cadena alimenticia. Además, el proceso de pasteurización no es suficiente para eliminar estas bacterias del producto por lo que es probable que lleguen al ser humano y transfieran su resistencia a otras cepas patógenas, complicando el tratamiento en el caso de enfermedad (2).

*E. faecalis* y *E. faecium* fueron las bacterias aisladas en mayor cantidad de las muestras de leche y a la vez presentaron índices de multiresistencia elevados (94% y 78% respectivamente). Además, estas son las dos especies que con mayor frecuencia causan patología en el ser humano (11). Esto representa un grave problema puesto que incrementa la incidencia de brotes de infecciones producidas por bacterias patógenas y/o emergentes transmitidas por alimentos, que son resistentes a antibióticos de uso común.

Cabe resaltar que de las especies de enterococos resistentes a vancomicina, 75% eran *E. faecium*. Estos hallazgos correlacionan con la literatura en el hecho de que se sabe que existe una marcada diferencia en la prevalencia de resistencia a vancomicina en cepas de *E. faecalis* (3-8% de resistencia) y *E. faecium* (46% de cepas resistentes) (2,14). Además, los datos resultan alarmantes debido a que estas bacterias son capaces de servir como reservorios de genes de resistencia, de manera que los pueden transferir a otras cepas que colonizan tracto gastrointestinal o genitourinario del ser humano, e incluso causar patología por sí solas.

El estudio de las distintas provincias del Gran Área Metropolitana reveló que existen porcentajes de resistencia similares entre ellas, sin diferencias significativas. No obstante, la resistencia a vancomicina estuvo circunscrita a la zona de Cartago. Lo anterior constituye un hallazgo significativo debido a que implica que se están diseminando determinantes de resistencia a antibióticos potentes a través de muestras que no provienen del ambiente hospitalario, sino más bien de productos de consumo masivo. Además, en Costa Rica esta es una de las provincias con mayor producción de leche (15). El problema se agrava por el reducido tamaño de nuestro país y la facilidad con la cual estos genes se pueden distribuir de Cartago al resto del Área Metropolitana y en un futuro, tal vez cercano, a todo el territorio nacional.

Con esta investigación se demuestra que existe un alto porcentaje de multiresistencia en *Enterococcus sp.* en leche no pasteurizada, además de una probable resistencia cruzada

entre algunos de los antibióticos analizados. Esto podría llegar a limitar el uso de estos fármacos a nivel clínico e impedir que se utilicen los sinergismos necesarios para combatir las infecciones por enterococos.

La utilización indiscriminada y constante de diversos antibióticos en agricultura y ganadería, induce una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas que trae como consecuencia la supervivencia de aquellas que son resistentes. Así, con el paso del tiempo, se produce un desequilibrio ecológico en el que disminuye el número total de microorganismos en la población, se limita el crecimiento de las bacterias sensibles y se favorece el de las resistentes al agente aplicado.

Finalmente, la presencia de cepas de enterococos resistentes a antibióticos es sumamente importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que aunque la mayoría de ellas son inocuas o rara vez producen problemas a nivel de salud pública, la existencia de genes de resistencia en las mismas podría llevar a la transferencia de este material genético a otros microorganismos y la subsecuente aparición de resistencia en bacterias que estén causando infección en el humano.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa colaboración de Laura Villalobos. Este proyecto recibió financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica, proyecto 803 A4 073.

#### REFERENCIAS

1. Cordiés L, Machado L, Hamilton M. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica, Cuba* 1998; 8(1):13-27.
2. Collignon P. Vancomycin-Resistant Enterococci and use of avoparcin in animal feed: is there a link? *Medical Journal of Australia*, 1999;171(3): 144-146.
3. Bates J. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *Journal of Hospital Infection*, 1997;37 (2): 89-101.
4. Campos M. Los antibióticos viajan en la leche. *Revista Rumbo*, San José 1995.
5. Vanderzant C, Splittstoesser D. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Third Edition, American Public Health Association. Estados Unidos, 1992.
6. Union of Concerned Scientists. *Antibiotic resistance*. Estados Unidos, 2000. <http://www.ucsusa.org/food-and-environment/antibiotic-resistance>.
7. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover F, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology*. Seventh Edition; American Society for Microbiology; Estados Unidos, 1999.
8. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelfth International Supplement; Estados Unidos, 2002;22(1).
9. Lukasova J, Sustackova A. *Enterococci and antibiotic resistance*, *Acta Veterinaria Brno*, 2003;72: 315-323.
10. Devriese L, Laurier P, De Herdt P, Haesebrouck F. Enterococcal and Streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992;72: 29-31.
11. Huycke M, Sahm D, Gilmore M. Multiple Drug Resistance Enterococci: The Nature of the Problem and an Agenda for the Future, *Emerging Infectious Diseases*, 1998;4 (2): 239-250.
12. Coghi R. Residuos de antibióticos en leche bovina pasteurizada suministrada a hospitales nacionales y regionales de Costa Rica. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional.,1993.
13. Robles D, Castillo P. Determinación de bacterias resistentes a tetraciclina y gentamicina en vegetales y legumbres cultivadas en el Valle Central de Costa Rica. Trabajo Final de Graduación. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica, 2002.
14. National Foundation for Infectious Diseases (NFID). *Enterococcal Resistance*. Estados Unidos, 1998;4(3).
15. Cooperativa de Productores de Leche, Dos Pinos R.L. Zonas de recolección en la Meseta Central. San José, 2004.

Recibido:01-11-2004

Aceptado: 10-06-2005

## Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica

Heylin Estrada, María del Mar Gamboa, Carolina Chaves y María Laura Arias

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Costa Rica

**RESUMEN.** La evaluación de la carga microbiológica presente en la miel comercializada en Costa Rica, así como la evaluación de su actividad antimicrobiana sobre diversos microorganismos, incluyendo varios asociados a infecciones de heridas, permitiría emitir criterios a favor o en contra de su utilización en el tratamiento de diversas lesiones, especialmente como una terapia alternativa en los casos donde las bacterias causantes son resistentes a los antibióticos. La carga microbiológica de 25 muestras de miel de abeja adquiridas en el comercio costarricense, se evaluó por medio de una serie de recuentos (recuento total aerobio, recuento total anaerobio, recuento de esporulados aerobios, recuento de esporulados anaerobios y recuento de hongos y levaduras). Además, las muestras se inocularon en tubos con medio Chopped Meat y posteriormente se sembraron en Agar Yema de Huevo para determinar la presencia de *Clostridium botulinum*. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel, se realizó un método de difusión en agar Muller-Hinton, donde se probaron diferentes diluciones de la miel (100, 75, 50, 25, 12.5 y 6.25% v/v) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116) y *Aspergillus niger*. La evaluación de la carga microbiológica de la miel mostró que el 91% de las muestras tenía valores iguales o menores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g y no se obtuvo ningún resultado positivo en la determinación de la presencia de *Clostridium botulinum*. 92% de las muestras mostraron algún tipo de inhibición sobre las bacterias evaluadas, un 24% logró inhibir el crecimiento de *S. aureus*, hasta en una concentración de 25% v/v. No se observó la inhibición de *Aspergillus niger* por ninguna de las muestras analizadas.

**Palabras clave:** Miel de abeja; Actividad antimicrobiana; *Clostridium botulinum*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Salmonella enteritidis*; *Listeria monocytogenes*; *Aspergillus niger*.

**SUMMARY.** Evaluation of the antimicrobial action of honey against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger*. Evaluation of its microbiological charge. The evaluation of the microbiological charge present in Costa Rican samples as the evaluation of its antimicrobial activity over different microorganisms, including those associated to wound infections, will allow to emit criteria referred to its use in therapeutic treatments, specially as alternative therapy for cases involving antibiotic resistant bacteria. The microbiological charge of 25 honey samples, acquired in Costa Rican markets was evaluated through several indicators including total plate aerobic count, total plate anaerobic count, total aerobic spore count, total anaerobic spore count and molds and yeast count. Also, samples were inoculated in tubes with chopped meat media and plated in egg yolk agar in order to determine the presence of *Clostridium botulinum*. For the antimicrobial activity evaluation, the diffusion method in Muller Hinton agar was performed, testing different honey concentrations (100, 75, 50, 25, 12.5 and 6.25% v/v) against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116) and *Aspergillus niger*. The results obtained for the microbiological characterization of honey show that 91% of samples had counts equal or lower than  $1,0 \times 10^1$  CFU/g. No positive result was obtained for the isolation of *C. botulinum*. 24 of the samples analyzed inhibited the growth of *S. aureus* even in a 25% v/v concentration, nevertheless, *A. niger* was not inhibited by any of the samples tested.

**Key words:** Honey, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger*.

## INTRODUCCION

La miel de abeja ha sido utilizada como medicina desde tiempos antiguos, principalmente para el tratamiento de heridas de piel, quemaduras, úlceras, infecciones oculares, dolor de garganta, así como otras afecciones. Este uso de la miel se inició de manera empírica, simplemente porque se conocía como un remedio efectivo y no por el conocimiento de sus propiedades antimicrobianas; aún en la actualidad, la miel sigue siendo ampliamente utilizada como medicina natural (1- 4).

Con el advenimiento del uso de los antibióticos, el interés se enfocó en el tratamiento de las infecciones con éstos. No fue sino hasta la aparición de diferentes cepas de bacterias resistentes a antibióticos que se recobró el interés por el posible uso de la miel como terapia alternativa, lo que ha llevado a un gran número de investigaciones a nivel mundial para probar la efectividad de la miel en el tratamiento de infecciones (1,5-7). Se han estudiado diferentes cepas bacterianas resistentes a antibióticos, obteniéndose resultados de sensibilidad por parte de éstas a la miel (1, 2,6,7); por otro lado, ésta ha sido utilizada en el tratamiento de heridas que no responden a los antibióticos convencionales, con buenos resultados (6,8). Actualmente se conoce que la efectividad de la miel en aplicaciones médicas, se debe muy probablemente a su amplia actividad antimicrobiana contra diversas bacterias y hongos, sin dejar de lado su capacidad de estimular la producción de citocinas en los monocitos (9).

La miel de abeja consiste en una solución concentrada de azúcares, principalmente glucosa y fructosa, que constituyen el mayor porcentaje de la miel, así como pequeñas cantidades de aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales y pigmentos. Contiene además cinco enzimas: invertasa, glucosa-oxidasa, amilasa, catalasa y fosfatasa ácida (1,4, 8,10).

Los valores de  $a_w$  de la miel de abeja se encuentran entre 0,56 y 0,62, valor que impide el crecimiento de casi cualquier microorganismo con excepción de algunas levaduras y bacterias osmofílicas. Sin embargo, si la miel es diluida, el  $a_w$  alcanzado ya no sería efectivo para inhibir el crecimiento de los microorganismos (1,2,4,6).

La miel tiene un pH ácido (3.5 - 4.5); esta acidez se debe a la presencia de ácidos orgánicos y representa un importante factor antimicrobiano (1,2,6). El principal ácido orgánico presente en la miel es el ácido glucónico, producto de la acción de la glucosa-oxidasa (1,2).

Se han identificado varias sustancias en la miel con propiedades antimicrobianas; diversos estudios han encontrado que la principal actividad antimicrobiana se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa (1,2,4,6,7). También, los fitoquímicos, especialmente los flavonoides y ácidos aromáticos (1,2,6,7,16) y los antioxidantes fenólicos son reconocidos por inhibir un

amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas (16). Por otro lado, aún cuando la presencia de lisozima en la miel no está bien esclarecida, en algunos reportes se menciona ésta como uno de los antimicrobianos presentes en la miel (11,16,17,20).

Dentro de las cargas microbianas normales de la miel de abeja se encuentran ciertas bacterias y levaduras. Esta carga microbiana de la miel suele ser baja y proviene de la misma flora bacteriana y fúngica de las abejas, así como del néctar de las flores; generalmente va a estar constituida por esporas del género *Bacillus* y por levaduras del género *Saccharomyces*, que, cuando crecen y se multiplican, son las causantes de la fermentación de la miel (8,21). Por otra parte, se debe tomar en cuenta que una manipulación inadecuada durante la recolección, procesamiento y almacenamiento de la miel, puede llevar a su contaminación de la misma con microorganismos patógenos (21).

La miel ha sido reconocida como una fuente de esporas de *Clostridium botulinum* y ha sido fuertemente asociada al botulismo infantil, y aunque hasta ahora no se ha reportado un caso de botulismo de heridas por uso de la miel sobre las mismas, existe un riesgo por el hecho de que la miel puede contener esporas de esta bacteria (8-13).

Costa Rica es un país donde la producción de miel de abeja representa una industria creciente, por lo que con este trabajo se pretende contribuir a un mejor conocimiento de ésta mediante la evaluación de la carga microbiológica presente en mieles comerciales costarricenses, así como su posible efecto antimicrobiano, con el fin de valorar su utilización a nivel de tratamiento de heridas, úlceras, quemaduras, etc.

## MATERIALES Y METODOS

### Recolección de muestras

Se obtuvieron 25 muestras de miel de abeja comercializadas en Costa Rica, las cuales fueron adquiridas al azar en supermercados, ferias del agricultor y mercados de diferentes zonas del país.

### Análisis bacteriológico

#### Recuento total aerobio

Se pesaron 10 g de la muestra de miel y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada estéril 0.1% (APE). Se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-4}$  en APE 0.1% y a partir de cada una se inocularon, por vaciado, platos de Agar Estándar + TTC (2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolium) que se incubaron a 35°C por 6-7 días en atmósfera aerobia.

#### Recuento total anaerobio

Se realizó de la misma forma que el recuento total aerobio, excepto por la incubación que se hizo en atmósfera anaerobia.

### Recuento de esporulados aerobios

Se pesaron 10 g de la muestra de miel y se diluyeron en 90 mL de APE 0.1%, posteriormente la dilución se llevó a ebullición durante 5 minutos. Con esta dilución madre se realizaron diluciones hasta  $10^{-4}$  en APE 0.1% y a partir de cada una se inocularon, por vaciado, platos de Agar Estándar + TTC, los cuales se incubaron de igual forma que para el recuento total aerobio.

### Recuento de esporulados anaerobios

Se realizó de la misma forma que el recuento de esporulados aerobio, excepto por la incubación que se hizo en atmósfera anaerobia.

### Determinación de la presencia de *Clostridium botulinum*

Se inocularon 1-2 g de miel en tubos con 15 mL de medio Chopped Meat por duplicado y se incubaron a 35° por 3-4 días. Uno de los tubos fue tratado con calor (80°C por 10 minutos) y ambos tubos se inocularon en Agar Yema de Huevo e incubaron en anaerobiosis a 35°C por 48 horas.

### Recuento de hongos y levaduras

Se utilizaron las mismas diluciones realizadas para el recuento total aerobio y a partir de cada una se inocularon por esparcimiento platos de Agar Papa Dextrosa Acidificado y se incubaron a temperatura ambiente durante una semana.

### Evaluación de la actividad antibacteriana

Se realizaron diluciones de cada miel de abeja en APE 0.1% para obtener concentraciones finales de 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% v/v. A partir de cultivos de 24 horas en placas de agar sangre de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116), se prepararon suspensiones en APE 0,1%, las cuales fueron ajustadas al 0.5 de la escala de McFarland. En un lapso no mayor de 15 minutos de ajustado el inóculo, se introdujo hisopo con algodón, se eliminó el exceso de líquido y se distribuyó en la superficie de placas de Agar Muller-Hinton de 4 mm de grosor, a las cuales previamente se les habían hecho seis pocillos, en tres direcciones rotando la placa aproximadamente 60° entre cada una para asegurar una distribución uniforme. A cada pocillo se agregaron 0,30 mL de la miel al 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% v/v, respectivamente. Se incubaron a 35°C por 18 horas y se midieron los halos de inhibición.

### Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Aspergillus niger*

Se realizó el método de difusión mencionado anteriormen-

te con las siguientes modificaciones: la suspensión al 0.5 de la escala de McFarland se realizó a partir de un filtrado conteniendo únicamente conidias de *A. niger* y las placas se incubaron durante tres días a temperatura ambiente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para el análisis microbiológico de las mieles de abeja. En términos generales, los resultados obtenidos fueron bastante bajos, lo cual era de esperarse, ya que las características propias de la miel de abeja, tales como su alta osmolaridad, viscosidad y bajo pH hacen de ésta un producto con recuentos bajos de microorganismos.

TABLA 1

Recuento total aerobio (RT), recuento total anaerobio (RTA), recuento de esporulados aerobio (RE), recuento de esporulados anaerobio (REA) y recuento de hongos y levaduras (HL) de 25 muestras de miel de abeja adquiridas en el mercado costarricense

Parámetro	RT	RTA	RE	REA	HL
≤ 10 <sup>1</sup> UFC/g	22 (88%)	25 (100%)	22 (88%)	25 (100%)	20 (80%)
> 10 <sup>1</sup> UFC/g	3 (12%)	0	3 (12%)	0	5 (20%)

Ciertos tipos de bacterias esporuladas y levaduras osmofílicas, provenientes de las abejas y las plantas, son las que comúnmente pueden encontrarse en la miel (8,21). Sin embargo, también puede haber bacterias vegetativas (8), pero a pesar de que estos microorganismos logran sobrevivir en la miel, no encuentran las características óptimas para multiplicarse en ella; por esta razón, cuando los recuentos totales son altos se deben probablemente a la contaminación por una manipulación inadecuada durante y después de la extracción del producto.

Aunque se podría haber esperado un mayor recuento de hongos y levaduras, puesto que las levaduras constituyen parte de los microorganismos encontrados normalmente en la miel de abeja (8,21), las muestras presentaron recuentos iguales o menores 10<sup>2</sup> UFC/g. Esto puede deberse a dos razones: al tratamiento con calor que se le realiza a muchas mieles con el fin de destruir las levaduras y evitar la fermentación de la miel, o también que naturalmente posean una baja carga de levaduras.

En la evaluación de la presencia de *Clostridium botulinum* no se obtuvo ninguna colonia sospechosa. Esto correlaciona muy bien con los resultados del recuento de esporulados anaerobios, los cuales fueron también bajos en todas las mieles evaluadas. Sin embargo, esto no indica que no exista la posibilidad de encontrar *C. botulinum* en las mieles comer-

cializadas en el país, ya que en Costa Rica se ha informado la presencia de esta bacteria en suelos y estudios similares llevados a cabo en España y Finlandia con un mayor número de muestras y usando las técnicas de PCR y dilución-centrifugación lograron detectar esta bacteria (8-13).

Con respecto a la evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel, la Tabla 2 presenta el efecto de diversas diluciones de miel de abeja sobre el crecimiento de bacterias. Se debe destacar que solamente dos de las mieles evaluadas (8%) no produjeron ningún tipo de inhibición en el crecimiento de las bacterias utilizadas en el estudio; el resto de las muestras inhibió el crecimiento de al menos una de las bacterias al emplear una concentración de 100% v/v de miel. *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo cuyo crecimiento se vio mayormente afectado por la miel, obteniéndose halos de inhibición aún con concentraciones de 50% v/v y de 25% v/v. Diversos estudios realizados han demostrado la sensibilidad de *S. aureus* a la miel de abeja, inclusive de cepas resistentes a antibióticos (21,22,23). Cooper *et al.* (16) reportan la sensibilidad a la miel natural de 18 cepas de *S. aureus* metilicina-resistentes aisladas de heridas infectadas y de 20 cepas de enterococos vancomicina-resistentes aisladas de superficies de ambientes hospitalarios en concentraciones de 10% (v/v) o menos, con el método de concentración mínima inhibitoria. Por otro lado, en un estudio desarrollado en India, por Subrahmanyam y Hemmady (17), se probó el efecto antibacteriano de diferentes mieles locales contra varias bacterias aisladas de heridas de quemaduras, incluyendo *S. aureus*, encontrándose que ninguna de las bacterias aisladas logró crecer en agar Muller-Hinton con concentraciones de 30% de miel. Estos datos son de gran importancia tomando en cuenta dos factores: este es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado de heridas infectadas y muchas cepas han desarrollado una gran resistencia a los antibióticos.

TABLA 2

Porcentaje de muestras de miel de abeja que ejercen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus* (A), *S. epidermidis* (B), *P. aeruginosa* (C), *E. coli* (D), *S. enteritidis* (E) y *L. monocytogenes* (F) según las concentraciones evaluadas

Concentración de miel (% v/v)	A% N=25	B%	C%	D%	E%	F%
100%	80	68	76	84	92	48
75%	52	24	36	32	44	20
50%	48	16	24	12	20	16
25%	24	0	8	0	8	0
< 25%	0	0	0	0	0	0

Por otro lado, las bacterias que mostraron menor inhibición por la miel fueron *L. monocytogenes* y *S. epidermidis*. *L. monocytogenes* mostró una marcada resistencia a los efectos antibacterianos de la miel. La resistencia de esta bacteria hacia ambientes adversos ha sido ampliamente documentada en estudios que incluyen su resistencia a bajos pHs, bajas temperaturas, bajos  $a_w$  y presencia de ácidos orgánicos, entre otros. Por otra parte, la resistencia *S. epidermidis* a diversos agentes antibacterianos también ha sido ampliamente demostrada. Las restantes bacterias evaluadas mostraron un comportamiento similar ante la miel de abeja, sin embargo, *E. coli* no fue inhibida por mieles con diluciones de 25% v/v a diferencia de *Salmonella enteritidis* y *P. aeruginosa*, lo cual resulta importante dada la frecuencia con que ésta última es aislada de heridas infectadas (24,25).

El 8% de las mieles evaluadas no tuvieron efecto alguno sobre el crecimiento microbiano. Esto sugiere que las propiedades de cada miel varían, lo que puede deberse a la fuente floral utilizada por las abejas para la recolección del néctar, así como a la zona donde se da la producción (1,2). Además de las características propias de cada miel, también se deben tomar en cuenta las posibles alteraciones—calentamiento excesivo, dilución con agua, agregado de otras sustancias— a las cuales se pudieron haber sometido las mieles con baja o ninguna actividad antimicrobiana.

En este estudio la cepa de *Aspergillus niger* utilizada no fue inhibida por ninguna de las mieles evaluadas. Varios trabajos han reportado actividad antifúngica principalmente contra especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (17). Efem y colaboradores analizaron diversas mieles sin procesar, las cuales presentaron actividad antifúngica contra hongos que comúnmente se encontraban en heridas quirúrgicas (21). Sin embargo, no todas las mieles que han presentado buena actividad antibacteriana han sido efectivas como antifúngicas (1).

Aún cuando las propiedades antimicrobianas de la miel comúnmente se le han atribuido a su alta osmolaridad y a la acidez, esto es cierto cuando la miel no ha sido diluida (6,18) y por esta razón probablemente fue que se observó la inhibición del crecimiento de las bacterias utilizadas en el estudio por la mayoría de las muestras probadas a una concentración del 100% v/v. Sin embargo, cuando la miel es diluida, ni la osmolaridad ni el pH son suficientes como agentes antimicrobianos (1,2,6), allí es donde cobran importancia el peróxido de hidrógeno y los componentes fitoquímicos. El efecto inhibitorio de diversas mieles sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. enteritidis* aún en concentraciones finales de 25% v/v, evidencia la presencia de otros factores responsables de sus propiedades antimicrobianas, fuera de su alto contenido de azúcares y pH ácido.

Un estudio indicativo de que el peróxido de hidrógeno contribuye a las propiedades antimicrobianas de la miel es el realizado por Taormina y colaboradores (22), quienes encon-

traron que la inhibición del crecimiento de *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* en soluciones de miel de 25% se disminuía luego de tratar dichas soluciones con catalasa.

En la miel los niveles de peróxido de hidrógeno son bajos, aproximadamente 1000 veces menos que las soluciones usadas como antisépticos, de manera que no causa daño tisular; sin embargo, sigue siendo efectivo como antimicrobiano. Parte de la efectividad como antimicrobiano del peróxido de hidrógeno se debe a la liberación lenta de éste y a la producción continua por parte de la glucosa-oxidasa (4,6).

Costa Rica es un país con una importante y variada producción de miel de abeja. La presencia de diversas mieles con actividad antimicrobiana implica múltiples beneficios, entre ellos una fuente natural y propia de un posible tratamiento para infecciones principalmente a nivel de piel. El paso a seguir es un estudio más profundo de cuales son los factores antimicrobianos predominantes en estas mieles, así como su capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos aislados de heridas, quemaduras y úlceras infectadas.

#### REFERENCIAS

1. The National Honey Board. Honey-Health and Therapeutic Qualities. (The National Honey Board, 390 Lashley Street Longmont, CO 80501-6045 USA). Disponible en: [www.nhb.org/download/factsht/compendium.pdf](http://www.nhb.org/download/factsht/compendium.pdf)
2. Bogdanov S. 1997. Antibacterial substances in honey. Swiss Bee Research Center en [www.apis.admin.ch/english/pdf/BeeProducts/AntibacterialInternet\\_e.pdf](http://www.apis.admin.ch/english/pdf/BeeProducts/AntibacterialInternet_e.pdf)
3. Molan PC. The role of honey in the management of wounds. *Journal of Wound Care*. 1990; 8:32-36.
4. Ramírez J, Calderón R, Ortiz R, Sánchez L. Manual de Apicultura. Programa de Publicaciones e Impresiones de la Universidad Nacional, Costa Rica. Tomo I, 2003; pp 44-77.
5. Manrique A, Párraga A. 1995. Producción de Miel y de Jalea Real. Fonaip Divulga en <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd48/texto/produccion.htm>
6. National Honey Board. pH & Acids in Honey. (The National Honey Board, 390 Lashley Street Longmont, CO 80501-6045 USA). Disponible en: <http://www.nhb.org/download/factsht/ph-acid.pdf>
7. Rodríguez M. Composición, calidad y consumo de miel en España. *Diario de la seguridad alimentaria* en <http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad-y-consumo/2003/07/15/7361.php>
8. Martins H, Martins L, Bernardo F. Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*. 2003; 98:86-88.
9. Tonks A, Cooper R, Jones K, Blair P, Parton, J. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* 2003; 7:21.
10. Nakano H, Okabe T, Hashimoto H, Sakaguchi G. Incidence of *Clostridium botulinum* in honey of various origins. *Jpn J Med Sci Biol*. 1990; 43:183-195.
11. Nevas M, Hielm S, Lindstrom M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*. 2002; 72:45-52.
12. Schocken-Iturrino RP, Carneiro MC, Kato E, Sorbara JO, Rossi OD, Gerbasi LE. Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999; 24:379-382.
13. NJ Department of Health and Senior Services. Communicable Disease Service Technical Information for Health Professionals. Communicable Disease Service Manual. *Clostridium botulinum*. Disponible en <http://www.state.nj.us/health/cd/manual/botulism.pdf>
14. McDonnell G. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clin Microb Rev*. 1999; 12:147-179.
15. Selection of honey for use on wounds. Waikato Honey Research Unit. University of Waikato. <http://honey.bio.waikato.ac.nz/>
16. Cooper RA, Molan PC, Harding K. The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J Applied Microb*. 2002; 93: 857-863.
17. Subrahmanyam M, Archan H, Pawar S. Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2001; XIV: 23-29.
18. Gheldof N, Engeseth N. Antioxidant capacity of honey from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 3050-3055.
19. Gheldof N, Wang X, Engeseth N. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:5870-5877
20. Molan PC. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2001 2(1): 13-19
21. Efem S, Udoh K, Iwara C. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection*. 1992; 20:227-229.
22. Taormina P, Niemira B, Beuchat L. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microb*. 2001; 69: 217-225.
23. Cooper R, Molan PC, Harding KG. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *J R Soc Med*. 1999; 92:283-285.
24. Cooper R, Molan P. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. *J Wound Care*. 1999; 8:161-164.
25. Cooper R, Halas E, Molan P. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil*. 2002; 23:366-370.

Recibido: 01-11-2004

Aceptado: 10-06-2005

## Amino acid composition of some Mexican foods

*Josefina Morales de León, Héctor Bourges y Ma. Elena Camacho*

Department of Food Science and Technology.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México.

**SUMMARY.** Knowledge of the amino acid composition of foods is essential to calculate their chemical score, which is used to predict protein quality of foods and diets. Though amino acid composition of many foods is reasonably well established, better knowledge is needed on native foods consumed in different regions and countries. This paper presents the amino acid composition of different presentations of raw and processed foods produced and consumed in Mexico. The amino acid composition was determined using Beckman amino acid analyzers (models 116 and 6300). Tryptophan was determined using the Spies and Chambers method. Of the different foods analyzed, some comments are made on native or basic foods in Mexico: Spirulin, where lysine is the limiting amino acid, with a chemical score of 67%, is a good source of tryptophan (1.16g/16 gN); amaranth contains high levels of sulphur amino acids (4.09 to 5.34 g/16gN), with a protein content of 15 g/100g; and pulque, a Pre-Hispanic beverage that contains high levels of tryptophan (2.58 g/16 gN) and sulphur amino acids (2.72 g/16 gN). Finally, insects are good sources of sulphur amino acids and lysine.  
**Key words:** Amino acid, food composition, Mexican foods.

**RESUMEN. Composición de aminoácidos en varios alimentos mexicanos:** La composición de aminoácidos es esencial para calcular la calificación química de un alimento, calificación que se utiliza para predecir la calidad de la proteína cuando se ingiere sola o como parte de la dieta. No obstante es necesario determinar la composición de aminoácidos de los alimentos consumidos diariamente en diferentes regiones y países. El presente artículo muestra la composición de aminoácidos en alimentos crudos y procesados en distintas presentaciones, que se consumen o procesan en México. La composición de aminoácidos de los distintos alimentos se determinó usando analizadores marca Beckman (modelos 116 y 6300). La determinación de triptofano se realizó con el método de Spies and Chambers. De los alimentos analizados, merecen una mención especial los siguientes: alga spirulina es limitante en lisina con una calificación química de 67% pero que es buena fuente de triptofano (1.16 g/16 gN), el amaranto alto en aminoácidos azufrados (4.09 a 5.34 g/16 gN) con un contenido de proteína de 15 g/100g y el pulque una bebida prehispánica, que tiene un alto contenido en triptofano (2.558 g/16 gN) y aminoácidos azufrados (2.72 g/16 gN). Finalmente, los insectos son una buena fuente de aminoácidos azufrados y lisina.

**Palabras clave:** Aminoácidos, composición de alimentos, alimentos mexicanos.

### INTRODUCTION

Food protein quality, ie the proportion of ingested amino nitrogen that is retained by the body, is a key nutritional issue since it varies widely from one food protein to another, affecting dietary nitrogen requirements and the interpretation of intake data.

Taking protein quality into consideration is particularly important in evaluating new protein sources, in providing nutritional education and dietary counseling to normal individuals under different physiological conditions (athletes, pregnant or lactating women, elderly persons),

in designing and regulating low-cost protein mixtures and in the development of products for special needs such as infant formulas, weaning foods, tube feeding, and treating inborn metabolic errors and other specific diseases (1).

The main determinant of food protein quality is its content of essential amino acids. Thus, the quality of a protein can be predicted from its amino acid composition calculating the chemical score and related indexes. The chemical score is the percentage of the most limiting amino acid in comparison to the so called reference amino acid pattern, which – theoretically – is fully utilized by the body. Reference scoring patterns changes as new know-

ledge on amino acid requirements is acquired. Although the FAO/WHO/UNU 1985 pattern is widely used (2), Young has proposed a new amino acid scoring pattern that takes into account results obtained in studies using amino acids labeled with stable isotopes (3).

A wealth of information on food composition has been gathered worldwide over decades of analytical efforts and research. Nonetheless, there is no data available on native foods or on a variety of regular foods consumed in different regions and countries. In Mexico, Cravioto, et al. began analyzing amino acid content in Mexican foods in 1947 (4, 5), but very little has been published subsequently on the subject. The Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) continued analyzing amino acids contained in different local foods and in 1996, some of this information was published in the Composition of Mexican Food tables (6). This paper includes data resulting from analysis done at the INNSZ during 1980-2002. Since referring individually to more than 180 foods analyzed would not be practical, the discussion and comments presented include only native foods for which no references can be found in literature on the subject and therefore no comparisons could be made.

## MATERIALS AND METHODS

### Obtaining and preparing samples

The products were obtained from self-service supermarkets in México City and at different stores at Central de Abastos, the largest food market in the city, which distributes foods from different parts of the country. Some products were received directly from people interested in obtaining an amino acid profile of their samples. For perishables, we got 1 kg samples and for industrialized foods we got three small packages of each brand selected.

The samples were transported to the laboratory in bags or plastic containers, at room temperature ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , 50% RH). The samples weighed at least one kilogram and were wrapped as they are regularly sold. Foods that required cleaning were cleaned manually to eliminate foreign bodies and damaged parts and then cut into small pieces, ground and homogenized in a blender (Osterizer). After this process was completed, the sample was ready for determining moisture and nitrogen content and for amino acid analysis. Determinations of moisture and nitrogen content were carried out twice and for amino acids.

Analysis were done in at least two samples; the average is reported.

### Analytical procedures

#### Moisture

One to two grams of the sample were homogenized and dried to a constant weight in a stove (Precision Mod. 28, Precision Scientific Group), at  $105^\circ\text{C}$  (7).

#### Nitrogen

Between 0.5 to 1.0g of the homogenized sample was weighed and digested with concentrated sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) for 30 to 60 minutes using a selenium and potassium sulfate tablet as catalyst. After digestion, the balloon flask with the sample was left to cool at room temperature. The sample was diluted with 75 mL of distilled water; 40% sodium hydroxide was added to this solution and released ammonia was received in a 1% solution of boric acid. Ammonium borate was titrated with a 0.1N solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (7, 8, 9) (Analyzer Procedure with Kjeltac 1035 Sampler System); (Technique described in the handbook Kjeltac Auto 1030 TECATOR).

To determine crude protein content, the nitrogen content obtained was multiplied by the following factors, as appropriate: 6.38 for milk and by-products, 5.95 for rice; 5.71 for soybean; 5.83 for whole wheat or flour; 5.70 for medium extraction flour and meal; 5.83 for barley and oats; 5.30 for sesame (10); 5.85 for amaranth and its by-products and 5.7 for the rest of the products, according to Sosulski (11).

#### Amino acid

##### Sample preparation

Defatting. Defatting was done when the ether extract (12) of the sample was greater than 10g/100. Approximately 100g of the sample were weighed and then washed with an 80:20 chloroform-methanol mix, until they reached an ether extract content of 5g/100g or less. The extracted sample was left to stand at room temperature for approximately two hours to eliminate any residues of the solvent mix (Kjeltac Auto Analyzer Tecator, Mod. 1030), (Technique described in the handbook Soxtec TECATOR HT 1043) (7, 18, 13).

#### Hydrolysis

##### a) Analysis of acid-stable amino acids

An aliquot part of the sample was weighed into four 250 mL boiling flasks; the amount was such that there would be 25 mg of protein in each flask. 60 mL of 6N hydrochloric acid and some boiling stones were added to two flasks. They were placed in reflux in an oil bath for 24 hours. The flasks were allowed to cool at room temperature.

Oxidizing the sample for sulphur amino acid analysis Performic acid was prepared adding 1 volume 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  to 9 volumes of 88% formic acid in a glass stoppered Erlenmeyer flask. Then the mixture was allowed to stand at room temperature for 1 hour, swirling occasionally;

then the flask was immersed in an ice bath for 30 minutes. The acid was prepared just before using. The other two flasks received 10 mL of cold performic acid each, not swirling. The flask was stoppered and placed in a cold room at 4°C for 16 hours. After this time had elapsed, the mixture was evaporated in a vacuum rotatory evaporator at 37°C (25 + 5 mmHg) until completely dry. The dry residue was resuspended with 60 mL HCL 6N, placed at 110°C + 5° for 18 hours and allowed to cool at room temperature.

The four hydrolysates were filtered through Whatman filter paper No. 42 into 250 mL boiling flasks. The flasks were rinsed three times with distilled water and filter rinse, evaporated until dry in a vacuum rotatory evaporator at 60°C, and then washed with distilled water until there was no acid odor. The residues were recovered from each flask using 25 mL of Na-S high performance sample dilution buffer, (Beckman reagent) and Whatman paper No. 42 and received in a dry and clean jar (7,14).

An aliquot part of 1 mL was taken from the filtrates and filtered through a 0.22 mm pore size polysulfonate or cellulose membrane; the filtrate was received in a 2 mL Eppendorf tube. A 100 µL aliquot part was taken from the latter and gauged with a Na-S high performance sample dilution buffer for each 1 mL. The analyzer coils were filled with this solution (Operate amino acid analyzer, according to manufacturer's instructions) (15).

#### Chromatographic analysis

Beckman 116 and 6300 (System Gold 6300, Beckman Coulter de México, S.A. de C.V.) amino acid analyzers were used and programmed according to manufacturer's instructions. Calibration curves were run with three injections of Beckman CD (Column Diagnostic Reagent and Standard) and STD (Amino Acid Standard for Hydrolyzate Analysis) mixtures. Samples were then placed in the corresponding coil, including a reference standard in one out of every five samples. For sulphur amino acids, the calibrating curve was run with a mixture of Beckman CD standards and methionine sulphonates from Sigma. The duration of each analysis was 80 minutes and working conditions were as follows: High performance sodium column (silicagel, 7.5 microns particle size), 12 cm long, a buffer flow of 14 mL/h, ninhydrin flow of 7mL/h; sequential temperatures were 48°C for 11 minutes, 65°C for 34 minutes, and 77°C for 74 minutes (15 - 17). The concentration of each amino acid was calculated using the ratio between the area of the sample and the area of the standards.

#### Determination of tryptophan

A sample of approximately 300 mg was weighed in

two test tubes; 12 mL of 0.4% papaine solution were added to each tube and then incubated at 65°C for 16 hours. The samples were then filtered through No.41 Whatman paper. Filtrates were received in three clean and dry test tubes and 5 mL of a 0.6% paradimethyl-amino-benzaldehyde solution in 12N hydrochloric acid were added to two of the tubes; 5 mL of 12N hydrochloric acid were added to the third tube (blank) and left to stand in the dark for 30 minutes. Next, 5 mL of 96% ethyl alcohol and 4 to 5 drops of a 0.2% sodium nitrate solution were added to the tubes and left to stand in the dark for an additional 30 minutes (18). Absorbance was read at 620 nm using a Beckman DU 780 spectrophotometer. Tryptophan standards of 0.1 to 0.5 micromoles per mL were included to obtain the calibration curves. Values were obtained by interpolation (7, 14).

#### Chemical score

The chemical score was calculated using scoring patterns suggested by Young (3).

## RESULTS AND DISCUSSION

The amino acid composition, the chemical score and the limiting amino acid of 222 Mexican Foods, some of which are native foods, are presented in Tables 1-7; empty spaces mean that there is no value available. Chemical scores were calculated using the scoring pattern for adults suggested by Young and Borgonha (3) because of its solid experimental support. Comments include only some particular items, mainly native foods of nutritional interest, as analytical considerations and literature comparisons are beyond the scope of this report.

**Spirulina** This microscopic alga belonging to the *Cyanophyceae* family, received much attention of nutritionists three decades ago as a potential protein source. Interestingly, historical documents indicate that spirulina was harvested from the waters of Lake Texcoco and consumed by the Aztecs as a food ingredient recently it has gained reputation as a cholesterol lowering functional food and it is sold in capsules as a food supplement in naturist stores. Spirulina protein is limiting in lysine with a chemical score of 67 but it is a good source of tryptophan ( % of scoring value).

**Amaranth** Interest in amaranth seeds has increased over the last two decades. Plants of this family are native to Mesoamerica and in Pre-Hispanic Mexico they represented the second largest crop only after maize.

Due to the importance of amaranth seeds in native religious practices, after the Spanish Conquest growing these plants was discouraged and even prohibited in the

New Spain by the Spanish domination (1521 to 1810) and its food use was limited to the leaves and to a candy made from popped seeds mixed with honey. Currently, amaranth cultivation and consumption are gaining popularity and, due to its sensorial qualities, its incorporation in a variety of products is expected to grow.

As it may be observed in Table 1, the seeds of the Mexican varieties of amaranth are limiting in lysine and leucine (~65%) but they are good sources of sulphur amino acids and have protein contents of around 15 g/100gN.

**Pulque** This Pre Hispanic beverage (Table 1) is still widely consumed in rural areas of central Mexico. It is obtained from the alcoholic fermentation of aguamiel, the sweet juice from the stalk of several species of maguey (*Agave* sp.). Although on a wet basis it provides only 0.3 mg/16mg of nitrogen, the volume consumed by some people may be high and its amino acid content is interesting since its protein is high in tryptophan (2.35 g/16gN) and sulphur amino acids (2.72 g/16gN) although it is limiting in lysine (39%).

**Corn.** Corn is still the staple food in the Mexican diet as it accounts for 50% of the energy intake and 40% of the protein intake of the average diet. Since Mexico is its site of origin, its importance has never been challenged by any other food either in Pre-Hispanic or modern diets. The Mexican varieties analyzed provide 8 to 9g of protein per 100g (Table 2); they are limiting in lysine (56%) and poor in tryptophan (63%), but are good source of sulphur amino acids.

Opaque 2 corn is a genetic variety developed by Mertz et al (19) which contains more glutelin and less zein than regular corn and is therefore richer in lysine (2.15 g/16gN in regular corn vs. 3.88 g/16gN in Opaque- 2 corn) and tryptophan (0.70 g/16gN in regular corn vs. 1.14 g/16gN in Opaque- 2 corn) and sulphur amino acids (4.28 g/16gN in regular corn vs. 5.35 g/16gN in Opaque- 2 corn). Chemical scores for regular corn is 55.8% in lysine vs 85% lysine in Opaque-2 corn.

**Insects** Entomophagy was, and still is, a common practice in Mexico, especially in rural areas of Central and Southern Mexico, but many restaurants in urban areas offer dishes based on different insects. To date, over one hundred edible species have been registered in the country (20).

Eating insects is not a result of poverty or famine; in Mexico it is a highly appreciated tradition with a significant ritualistic meaning. Furthermore, insects are quite expensive and are considered a delicacy that is frequently offered in fancy restaurant menus. As expected, insects have a high moisture content and provides around 20% of protein. The species analyzed have different

amino acid compositions, but as a group they are usually limiting in tryptophan, with chemical scores ranging from 10% (jumiles) to 80% (escamoles). In general, all insects are good sources of sulphur amino acids and, with the exception of jumiles, they are also good sources of lysine.

**Common beans** (*Phaseolus vulgaris*) are the most highly consumed legume seed in Mexico and, combined with corn, for the last three millennia they have formed the basic complementary cereal-legume system in the Mexican diet. The samples analyzed (Table 5) had a chemical score of around 80% and were limiting in tryptophan and isoleucine (light brown beans) but not in sulphur amino acids (2.50 g/16gN to 5.19 g/16gN) as usually reported; this finding deserves further research.

Although vegetables have high moisture content and provide little protein, their contribution may be relevant because of the amount consumed. Table 7 presents the amino acid composition of some vegetables.

**Nopal** (*Opuntia* sp.) is a cactus that is widely distributed throughout Mexico and it is used in many traditional dishes. It is extremely popular as a remedy for diabetes, probably because of its high content of soluble dietary fiber. Its protein content is only 1.4 g/100g but its chemical score is close to 90%, leucine and tryptophan as the limiting amino acids.

The pulp and the pods of mezquite are mainly consumed in rural areas. The pods are particularly interesting because of their protein content of 23 g/100g and their high chemical score (~100%).

**Quiote** is the flower of maguey. It is a delicacy reserved for special occasions due to its relative scarcity. Its protein content is only ~1g/100g but its amino acid composition is very well balanced, with a chemical score close to 100%.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Héctor Ledesma and Eva Vara Flores for their analytical support. This work was partially supported by CONACYT (PCALCNA-030874).

## REFERENCES

1. Matthews DE. Protein and amino acid. In: Shils M. E., Olson J.A., Shike M. Ross K. Modern nutrition in health and diseases. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1999. p. 43-58.
2. AO Nutrition Meetings Report series No. 52; WHO Technical Report Series, No. 522. Energy and protein requirements: report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. World Health Organization: Genoa, Italy; 1973.

3. Young V, Borgonha S, Nitrogen and amino acid requirements. The Massachusetts Institute of Technology amino acid requirement pattern. *J Nutr.* 2000; 130: 1841S-1849S.
4. Cravioto OY, Figueroa F. de Ma., Cravioto RO, Massieu HG. Estudio sobre las proteínas y aminoácidos en dietas mexicanas. *Ciencia* 1953; 13: 65-70.
5. Suárez ML, Massieu HG, Cravioto RO, Guzmán GJ. Nuevos datos sobre el contenido en aminoácidos indispensables en alimentos mexicanos. *Ciencia* 1954; 14: 19-32.
6. Morales de León J, Babinsky V, Bourges H, Camacho PM. Tables of Composition of Mexican foods. [Published in CD-ROM Interactive Multimedia]. Mexico: INCMNSZ; 2000. ISBN: 968-6499253.  
<http://www.innsz.mx/alimentos/cd.html>.
7. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International. 16th ed., 5th Revision. Washington, D.C. 1999.
8. Tecator. Kjeldahl procedure with Kjeltex Auto Systems. Hogänäs (Sweden): Tecator; 1981.
9. Norma Mexicana, NMX-F-068-1980, Determinación proteínas en quesos.
10. Hernández M, Chávez A, Bourges H. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Tablas de uso práctico. Publication L-12 10ª edition, Mexico. INN; 1987.
11. Sosulski FW, Imafidon GI. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *J Agric Food Chem.* 1990; 38: 1351-1356.
12. Tecator. Soxtec System HT6. Hogänäs, (Sweden): Tecator; 1987.
13. Mexican Standard, NMX-F-89-S-1978, Determinación del extracto etéreo en alimentos.
14. AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 9th ed., USA; 1995.
15. Beckman. Manual for the amino acid analyzer. Palo Alto, California: Spinco Division of Beckman Instruments Inc.; 1969.
16. Arrizon LV, Slocum R., Lee P. Expanded Protein Hydrolyzate analysis. System 6300/7300 Application Notes No. A630-AN-007., Palo Alto, California: Spinco Division of Beckman Instruments Inc.; 1987.
17. Spies JR, Chambers DC. Chemical Determination of Tryptophan in Proteins. *Analytical Chem.* 1949; 21: 1249-1259.

Recibido: 01-06-2004

Aceptado: 11-08-2005

TABLE 1  
Amino acid content in Mexican foods  
Algae, Amaranth and by-products, Beverages  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g produc	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>I. ALGAE</b>													
SPIRULINA ( <i>Spirulina geltleri</i> )	7.90	57.31	3.56	5.63	3.31	1.65	0.65	3.62	2.53	3.60	1.06	4.16	0.91
<b>II. AMARANTH AND BY-PRODUCTS</b>													
<b>AMARANTH (<i>A. Leucocarpus</i>)</b>													
BURST	5.30	15.56	3.07	3.80	3.12	2.35	2.49	2.99	2.55	2.72	0.77	2.99	1.60
FLOUR	3.24	16.39	3.62	5.46	4.35	2.11	1.53	3.64	3.38	2.95	1.44	3.86	2.29
GERMINATED			3.06	2.94	2.85	2.58	2.91	2.93	2.56	2.56	0.87	3.09	1.44
NIXTAMAL-PROCESSED AMARANTH FLOUR			2.76	3.68	3.59	1.72	2.31	2.84	2.54	2.72	0.97	2.71	1.63
ROASTED			3.39	4.20	3.44	2.59	2.75	3.31	2.82	3.00	0.85	3.31	1.77
SEED	8.70	15.29	2.43	3.39	3.83	1.68	1.96	2.71	2.34	2.41	0.73	2.44	1.50
WHOLE FLOUR	8.35	17.42	3.55	5.29	4.96	2.01	2.18	3.53	3.25	2.97	1.32	3.61	2.09
<b>BEER</b>													
BOTTLED	95.53	0.27	3.30	4.25	4.76	1.39	1.39	2.2	1.20	2.52	0.58	3.22	4.16
PULQUE	98.90	0.27	4.04	8.65	1.76	1.12	1.59	6.45	2.76	4.21	2.35	5.12	2.01
<b>NON-ALCOHOLIC BEVERAGES</b>													
<b>MILK BASED</b>													
CHOCOLATE FLAVOR	3.33	12.05	3.80	7.24	5.48	1.93	1.41	4.05	3.41	3.63	1.16	4.72	2.10
<b>POWDER MIXTURE</b>													
PROTEIN 40	7.50	15.14	3.35	9.34	7.22	0.92	1.58	2.05	2.12	4.98	1.66	3.40	0.84
PROTEIN 80 CHOCOLATE FLAVOR	5.25	66.41	4.16	7.94	9.05	2.69	2.09	5.04	4.43	3.67	1.08	5.44	2.14
PROTEIN 80 CHOCOLATE FLAVOR	5.36	61.10	4.2	3.5	4.10	3.05	2.09	3.50	2.97	3.07	1.4	4.45	1.33
PROTEIN 80 COCONUT FLAVOR	3.10	68.28	4.72	9.66	6.08	2.79	2.47	4.92	4.43	3.56	1.03	4.90	2.06
PROTEIN 80 COCONUT FLAVOR	4.80	68.22	4.36	3.90	4.38	3.74	2.01	3.71	3.28	2.79	1.16	4.61	1.45

TABLE 2  
Amino acid content in Mexican foods  
Cereal seeds  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>IV. CEREALS SEEDS</b>													
<b>BARLEY (<i>Hordeum distichum</i>)</b>													
FLOUR	8.20	9.85	3.57	6.94	4.21	1.57	4.12	5.27	3.11	3.20	0.79	4.56	2.25
GRAIN	10.55	9.05	4.17	7.03	3.37	1.51	2.05	5.27	2.39	3.52	1.35	5.30	2.19
<b>CORN (<i>Zea mays</i>)</b>													
BLUE	10.60	6.51	2.15	7.30	3.12			3.03	2.73	2.54	0.69	3.37	2.40
CREOLE FROM CHALCO		9.59	3.34	11.77	2.54	2.37	5.33	4.82	3.87	3.06	0.63	4.14	1.95
ENRICHED NIXTAMAL FLOUR	6.80	9.85	2.05	10.04	3.40	1.56		3.85	2.69	3.07	0.71	2.15	4.09
MEAL, WITH SOY	7.30	9.30	3.48	10.14	4.31	2.38	0.67	4.52	3.17	3.13	1.05	3.86	2.42
NIXTAMAL FLOUR	8.00	7.84	3.16	10.73	3.00	4.24	4.22	3.91	3.11	3.24	0.62	4.22	2.82
NIXTAMAL FLOUR	9.00	8.93	3.48	9.25	3.21	2.08	3.66	3.76	3.13	3.02	0.77	4.38	2.60
NIXTAMAL FLOUR	9.30	8.12	3.07	11.60	2.41	1.48		3.76	3.01	3.02	0.52	3.78	2.52
NIXTAMAL FLOUR	7.70	7.84	3.14	11.76	2.54	1.65		3.89	3.19	3.15	0.57	3.81	2.70
NIXTAMAL FLOUR	11.90	7.97	3.18	11.00	4.38	3.45	2.91	4.06	3.39	2.78	0.57	3.64	2.96
OPAQUE 2		11.01	2.79	7.08	3.88	2.79	2.56	3.70	3.61	2.50	1.14	3.52	3.37
TORTILLA	42.90	8.48	1.81	10.18	2.25	1.47	1.66	4.34	3.62	2.85	1.47	2.95	0.05
WHITE FLOUR	9.30	8.12	0.25	9.48	2.34	1.71	2.30	8.24	2.62	1.53	1.53	3.60	2.10
WHITE FLOUR	10.10	8.03	2.50	9.87	2.15	1.85	2.43	5.98	2.85	2.12	2.12	3.65	2.21
WHITE GRAIN	10.80	8.21	1.97	7.80	2.14			3.28	3.00	2.62	0.61	2.75	1.38
WHITE GRAIN	10.40	9.03	3.06	8.68	2.70			3.76	3.27	3.04	0.59	3.88	2.18
YELLOW CREOLE		8.86	3.86	12.18	2.17	2.33	3.54	4.65	3.47	3.24	0.70	4.72	1.75
YELLOW FLOUR	8.10	7.20	2.65	9.68	2.60	1.92	2.39	7.04	2.84	3.03	2.21	3.74	2.28
YELLOW FLOUR	8.40	7.02	2.71	9.79	2.64	1.95	2.40	7.72	3.00	2.93	1.92	3.91	2.25
<b>MILLET (<i>Panicum millaceum</i>)</b>													
GRAIN	11.80	9.67	3.96	11.97	1.56	2.16	1.63	5.09	3.37	2.79	1.26	4.96	2.09
<b>OATS (<i>Avena sativa</i>)</b>													
FLOUR	6.00	18.18	4.16	7.33	3.79	1.73	3.31	5.15	3.04	3.26	1.62	5.46	2.32
<b>RICE (<i>Oryza sativa</i>)</b>													
BREAKFAST CEREAL	2.10	12.60	3.18	7.80	4.07	2.60	0.67	4.19	3.61	2.89	1.18	3.03	4.07
MILLED GRAIN	12.05	7.20	3.34	5.96	3.94	1.48	0.92	4.05	4.04	2.55	1.50	4.23	1.91
<b>RYE (<i>Secale cereale</i>)</b>													
RAW	11.00	11.04	3.33	5.45	2.64	1.07	2.09	4.09	1.72	3.05	1.10	4.47	1.92

TABLE 2  
 Amino acid content in Mexican foods  
 Cereal seeds  
 (g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>IV. CEREALS SEEDS</b>													
<b>SORGHUM (<i>Sorghum vulgare</i>)</b>													
DEHULLED GRAIN			3.70	13.48	1.64	1.41	3.27	4.36	3.06	1.44	0.81	4.37	2.02
FLOUR	3.80	18.09	3.83	12.56	1.78	1.61	3.14	4.93	3.88	3.01	0.57	3.49	1.72
GLUTEN		51.25	3.83	13.21	1.50	1.36	1.56	5.18	4.07	2.33	0.36	4.59	1.93
WHOLE GRAIN	10	7.52	3.42	11.47	1.83	1.26	2.54	4.73	3.38	2.93	0.51	4.07	1.44
<b>TRITICALE (<i>Triticum x Secale triticales</i>)</b>													
RAW		20.20	4.14	6.72	3.04	1.92	2.78	4.75	2.32	3.14	1.58	5.01	2.48
<b>WHEAT (<i>Triticum aestivum</i>)</b>													
COOKIE	7.80	9.18	3.31	6.64	1.24	1.33	4.20	4.75	2.99	2.64	0.74	3.40	2.33
FLOUR	13.47	11.66	3.68	6.70	2.68	1.80	3.73	5.05	3.63	2.95	1.04	4.27	2.16
GRAIN	10.10	9.77	3.01	8.30	2.92	1.17	5.40	3.88	2.58	2.42	1.12	3.85	2.75
GRAIN	7.80	11.60	3.40	7.00	2.00	1.70	5.80	4.91	2.99	2.40	0.60	3.80	2.01
SEMOLINA	13.40	13.62	4.05	6.78	1.93	1.53	3.56	4.54	2.85	2.36	1.75	3.75	1.82
SOUP (PASTA)	0.19	12.22	2.86	7.69	2.04	1.95	3.93	4.60	2.38	2.74	0.80	3.41	2.21
WHITE BREAD LOAF (SLICED)	35.60	8.40	3.47	6.51	1.65	1.62	2.49	4.51	3.29	2.62	1.66	4.26	1.44

TABLE 3  
Amino acid composition of Mexican food  
Dairy products, Eggs, Fish and Shellfish  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>V. DAIRY PRODUCTS</b>													
<b>CHEESE</b>													
"ASADERO"	46.65	22.85	4.45	7.46	7.59	2.26	0.20	4.33	4.32	3.26	1.52	5.21	2.61
<b>COW MILK</b>													
PASTEURIZED AND HOMOGENIZED (WHOLE FLUID)	10.55	9.05	4.17	7.03	3.37	1.51	2.05	5.27	2.39	3.52	1.35	5.30	2.19
PASTEURIZED AND HOMOGENIZED (WHOLE FLUID)	90.50	2.74	5.47	10.40	4.25	2.59	2.07	4.90	6.21	4.04	1.91	5.64	0.99
POWDERED	88.88	2.78	3.81	7.38	6.29	2.16	1.15	8.44	3.61	3.87	6.76	4.69	1.92
POWDERED SKIMMED	3.50	25.40	4.29	8.32	6.54	3.36	0.84	7.11	4.01	3.82	2.23	5.40	2.36
ULTRAPASTEURIZED (WHOLE FLUID)	3.11	30.56	4.30	8.60	7.50	2.10		4.20		3.70	1.40	4.80	
ULTRAPASTEURIZED (WHOLE FLUID)	88.55	2.55	3.91	7.63	6.34	2.55	0.86	9.26	4.04	3.61	6.48	4.96	3.41
<b>HUMAN MILK</b>													
AVERAGE	87.10	1.10	5.28	9.20	7.68	2.73	0.94	4.16	5.16	4.72	2.07	5.35	1.73
14 DAYS AFTER CHILDBIRTH (AVERAGE)		1.25	5.28	8.81	7.76	2.91	1.05	4.22	5.15	4.90	1.92	5.21	1.72
56 DAYS AFTER CHILDBIRTH (AVERAGE)		0.99	5.14	8.84	7.46	2.86	0.96	4.17	5.11	4.73	2.04	5.37	1.68
112 DAYS AFTER CHILDBIRTH (AVERAGE)		0.91	5.62	9.68	7.82	2.83	0.97	4.18	4.95	4.59	2.07	5.55	1.75
168 DAYS AFTER CHILDBIRTH (AVERAGE)		0.97	5.28	9.27	7.79	2.60	0.85	4.15	5.05	4.76	2.13	5.08	1.82
252 DAYS AFTER CHILDBIRTH (AVERAGE)		0.99	5.08	9.19	7.48	2.34	0.78	4.14	5.25	4.80	2.10	5.24	1.73
385 DAYS AFTER CHILDBIRTH (AVERAGE)		0.88	5.28	9.43	7.81	2.78	1.04	4.11	5.21	4.50	2.21	5.63	1.76
<b>WHEY</b>													
CONCENTRATED			5.10	11.52	9.17	2.32	5.81	3.50	3.59	4.86	0.89	5.20	2.17
DEMINERALIZED		14.98	5.09	8.49	7.14	2.94	3.16	2.92	2.58	5.78	2.47	5.08	2.08
<b>YOGHURT</b>													
UNFLAVORED	8.10	7.20	2.65	9.68	2.60	1.92	2.39	7.04	2.84	3.03	2.21	3.74	2.28
UNFLAVORED	87.90	3.47	3.38	9.23	10.19	2.15	2.05	4.33	4.55	3.59	2.01	4.87	2.72

TABLE 3  
Amino acid composition of Mexican food  
Dairy products, Eggs, Fish and Shellfish  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>VI. EGGS</b>													
<b>DUCK</b> ( <i>Anas platyrhynchos</i> )													
WHOLE, RAW	70.83	11.68	3.47	6.68	8.44	4.50	4.19	5.93	3.83	5.29	0.97	5.20	2.74
<b>HEN</b> ( <i>Gallus gallus</i> )													
RAW EGG WHITE, RED	87.30	9.48	4.19	7.08	5.58	2.20	1.92	5.23	3.02	3.71	2.69	5.56	1.90
RAW EGG WHITE, WHITE	86.90	10.12	4.49	7.52	5.96	2.88	2.15	5.22	3.22	3.99	2.46	5.81	2.00
RAW WHOLE RED	75.40	11.13	4.54	7.53	6.27	3.24	2.60	5.49	3.67	4.25	2.23	5.67	2.07
RAW WHOLE WHITE	76.60	11.58	4.55	7.51	6.37	3.28	2.46	5.16	3.74	4.19	2.73	5.65	2.07
RAW YOLK, RED	52.50	13.81	4.58	7.50	6.66	4.98	1.65	3.99	3.87	4.54	2.94	5.16	2.12
RAW YOLK, WHITE	53.00	14.68	4.80	8.01	7.02	1.05	2.32	4.23	3.87	4.69	2.56	5.40	2.32
<b>VII. FISH AND SHELLFISH</b>													
<b>FISH</b>	7.80	9.18	3.31	6.64	1.24	1.33	4.20	4.75	2.99	2.64	0.74	3.40	2.33
<b>ANCHOVY</b> ( <i>Engraulis mordax</i> )	68.50	15.37	4.24	7.37	9.01	2.64	1.82	3.84	3.29	4.31	0.74	4.70	2.88
<b>FISH (FLOUR)</b>	3.00	82.17	2.50	5.28	2.12	0.47	3.10	2.99	2.95	2.15	0.08	4.43	0.84
<b>GREY MULLET</b> ( <i>Mugil cephalus</i> )													
RAW	71.60	18.79	4.71	7.45	8.67	2.96	1.59	3.94	3.17	4.01	1.02	4.98	2.80
<b>MOJARRA</b> ( <i>Eugerres spp.</i> )	72.50	15.96	3.94	6.12	12.16	2.44	1.01	2.41	0.71	3.36	0.24	4.69	1.62
<b>SARDINE</b> ( <i>Sardinopus caerulea</i> )													
PROTEIN CONCENTRATE	5.00	83.27	5.88	8.14	7.83	3.08	0.52	5.23	3.92	3.60	1.23	2.41	2.91
RAW	70.15	16.64	4.48	7.43	5.62	2.43	1.44	3.77	2.76	3.99	0.88	5.50	4.57
<b>SAWFISH</b> ( <i>Scomberomorus maculatus</i> )	74.10	20.34	2.37	6.34	7.00	3.67	1.40	2.95	3.14	3.74	0.77	3.01	2.20
<b>SHELLFISH</b>													
<b>OYSTER (WHOLE)</b> ( <i>Ostrea sp.</i> )	91.30	5.47	3.94	6.60	6.72	3.65	1.76	4.82	3.38	4.06	2.10	4.02	1.80
<b>SHRIMP (FLOUR)</b> ( <i>Penaeus setiferus</i> )	8.40	23.42	4.23	6.24	9.31	1.48	1.90	4.10	3.80	3.49	0.90	4.84	6.32

TABLE 4  
Amino acid content in Mexican foods  
Insects  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>IX. INSECTS</b>													
<b>ANT (<i>Atta mexicana</i>)</b>													
CHICATANA (LARVAE)	74.30	10.85	4.85	7.36	4.43	1.81	1.38	3.80	4.29	3.92	0.59	5.84	2.29
CHICATANA (REPRODUCTIVE ADULT)	50.60	15.50	4.83	7.30	4.47	3.10	1.37	8.03	4.29	3.92	0.55	5.84	2.28
<b>ESCAMOLE (<i>Liometopum apiculatum</i>)</b>													
ADULTS (EGG, LARVAE AND PUPAE)	70.80	9.94	4.47	6.93	5.29	2.92	1.28	4.20	9.76	3.83	0.73	5.47	2.64
WORKING (EGG, LARVAE AND PUPAE)	68.40	11.76	3.47	11.22	6.75	6.20	4.47	10.67	6.38	2.46	0.47	2.92	5.29
WORKING (LARVAE AND PUPAE)	70.80	9.94	3.98	8.08	5.47	1.69	2.15	3.17	4.92	3.16	0.57	4.37	3.16
<b>FLY (<i>Musca domestica</i>)</b>													
COMMON	80.50	9.67	3.99	7.11	6.62	2.04	2.14	5.41	6.37	4.03	0.53	4.67	2.65
<b>GRASSHOPPER (<i>Sphenarum purpurascens</i>)</b>													
ADULT	42.40	30.64	3.37	6.03	4.43	1.24	0.83	2.46	5.27	3.02	0.34	5.38	1.94
ADULT	42.40	30.64	3.83	8.12	5.20	2.28	1.64	9.39	5.75	3.47	0.59	5.20	2.01
NYMPH	42.00	32.83	4.83	7.93	5.20	1.82	1.19	10.67	6.66	3.65	0.55	4.65	1.00
<b>HONEYBEE (<i>Apis mellifera</i>)</b>													
LARVAE AND PUPAE	7.26	42.65	3.75	6.02	5.49	1.79	0.87	2.77	3.72	3.12	0.68	4.43	2.10
<b>POXI (<i>Ephydra hians</i>)</b>													
			4.53	7.24	5.25	1.48	2.02	4.52	4.65	4.21	0.38	5.09	0.94
<b>WASP (<i>Polybia parvulina</i>)</b>													
BLACK	77.09	12.21	4.24	7.10	6.68	2.14	2.61	3.14	5.37	3.81	0.67	5.59	3.15
CASTILLA HONEYCOMB	72.03	12.73	4.04	7.07	3.27	1.61	1.84	3.59	6.85	3.99	0.60	4.90	3.27
WHITE-WINGED	68.72	19.55	3.82	7.01	5.33	1.79	2.22	3.94	6.46	4.27	0.46	5.23	2.64
YELLOW HORNET	68.03	17.80	4.69	7.72	5.58	1.27	1.44	3.78	5.93	4.05	0.64	5.79	2.54
<b>WORM</b>													
JUMIL ( <i>Euschistus strennus</i> )	40.15	20.07	3.53	6.97	4.61	3.32	1.91	2.89	5.06	3.52	0.51	5.34	3.05
JUMIL (NYMPH AND ADULT)	7.30	42.59	3.74	7.02	2.83	2.70	0.91	9.30	6.02	3.83	0.09	6.66	1.64
JUMIL (NYMPH AND ADULT)	11.40	33.93	3.56	6.93	4.56	5.40	1.92	7.93	5.11	3.56	0.51	5.38	3.01
MAGUEY RED ( <i>Comadia redtenbacheri</i> )	69.63	8.49	4.65	7.25	4.51	0.84	1.20	3.73	4.87	4.30	0.55	5.58	1.44
MEZQUITE (NYMPH AND ADULT)	57.30	25.44	3.83	6.29	4.10	3.28	2.19	13.13	5.29	3.28	0.53	5.65	6.38
PINK, LARVAE ( <i>Cossus redtenbacheri</i> )	6.20	27.54	4.65	7.20	4.90	1.92	1.19	8.48	4.83	4.29	0.55	5.56	1.46
WATER, LARVAE ( <i>Ephydra hians</i> )	8.40	5.20	4.56	7.30	5.80	3.47	2.01	9.21	4.65	4.20	0.38	5.11	0.91

TABLE 5  
Amino acid content in mexican foods  
Legume seeds, Oilseeds and By-products  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>X. LEGUME SEEDS, OILSEEDS AND BY-PRODUCTS</b>													
<b>KIDNEY BEAN (AYOCOTE) (<i>Phaseolus coccineus</i>)</b>													
COOKED, DRIED	11.25	18.19	5.35	9.25	6.24	1.15	2.98	6.81	4.04	4.67	0.16	6.20	2.06
RAW	11.92	18.50	4.49	8.04	7.22	1.15	4.02	6.11	3.59	4.86	0.16	5.62	2.49
<b>BEAN (<i>Phaseolus vulgaris</i>)</b>													
BLACK, COOKED	65.74	8.86	4.47	7.77	9.50	1.36	1.95	5.50	3.03	4.35	0.96	5.10	3.49
BLACK, GERMINATED DRIED	10.01	27.60	4.24	7.62	10.47	1.71	3.48	5.46	3.28	3.90	0.58	4.65	3.94
COOKED JAMAPA NONFAT FLOUR			4.57	9.00	6.20	1.51	1.37	5.67	3.37	4.02	0.96	5.41	2.41
FLOUR	8.47	19.70	4.78	8.50	9.24	1.20	2.70	6.00	3.67	4.90	0.94	4.99	3.34
JAMAPA NONFAT FLOUR			5.00	9.18	5.65	1.37	1.21	5.60	3.44	3.94	0.82	5.97	1.71
LIGHT BROWN	11.75	23.58	3.31	6.93	9.24	1.24	1.26	5.44	3.36	4.34	1.01	3.75	1.78
<b>BROAD BEAN (FABA BEAN) (<i>Vicia faba</i>)</b>													
RAW	8.30	23.07	3.95	8.66	6.44	0.83	1.26	4.16	3.25	3.59	0.74	4.24	2.08
<b>CACAO (<i>Theobroma cacao</i>)</b>													
RAW	3.60	10.94	4.13	8.16	8.65	1.16	1.50	4.66	3.56	2.46	0.36	3.35	2.91
<b>COTTONSEED (<i>Gossypium herbaceum</i>)</b>													
SEED	6.12	48.19	2.98	6.15	4.30	1.58	4.46	5.37	3.08	3.67	0.75	3.72	2.11
<b>CHICK PEA (<i>Cicer arietinum</i>)</b>													
FLOUR	8.92	15.50	4.13	6.87	6.36	1.19	2.74	5.48	2.88	3.34	0.36	4.28	2.15
GERMINATED AND DRIED	8.90	18.24	3.84	6.73	5.65	1.37	3.59	6.51	3.24	3.33	0.52	4.03	2.23
<b>ROYAL PONCIANA (<i>Delonix regia</i>)</b>													
WHOLE FLOUR	8.20	18.50	3.31	6.79	4.24	1.35	3.54	4.31	3.03	2.58	0.63	3.38	1.88
<b>GUANACASTE, EARPODTREE (<i>Enterolobium cyclocarpum</i>)</b>													
ROASTED DEHULLED SEED	2.00	31.04	4.23	8.04	5.65	1.61	0.20	4.02	4.09	3.49	0.40	4.32	5.03
SEED, RAW WHOLE FLOUR	6.90	32.08	4.00	7.73	6.95	1.99	0.35	3.60	3.57	3.39	0.92	3.95	6.15
SEED, RAW WHOLE	8.00	17.83	4.43	8.03	6.10	1.61	0.30	3.87	3.53	3.48		4.49	5.09
WHOLE POD	10.90	13.17	4.55	7.24	6.68	1.84	0.41	3.90	3.75	3.75		4.24	4.29
<b>GUAJE (<i>Leucaena esculenta</i>)</b>													
SEED, DEHULLED FLOUR	8.70	26.08	4.72	11.68	5.75	1.45	1.91	5.13	3.01	2.60	0.78	5.13	2.52
<b>JOJOBA (<i>Simmondsia chinensis</i>)</b>													
PASTE	9.22	20.90	3.46	7.12	4.48	1.07	4.28	4.45	4.49	4.30	1.86	5.20	1.33
RAW (SEED)	4.23	12.26	3.37	7.04	4.74	1.00	4.92	4.33	4.46	5.25	1.98	4.84	1.82

TABLE 5  
Amino acid content in mexican foods  
Legume seeds, Oilseeds and By-products  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>X. LEGUME SEEDS, OILSEEDS AND BY-PRODUCTS</b>													
<b>LINSEED</b>													
RAW			4.09	5.38	3.37	1.59	1.61	4.09	2.02	3.45	1.78	5.33	2.26
<b>PEANUT (<i>Arachis hypogaea</i>)</b>													
TEXTURIZED	8.00	49.34	3.26	6.92	3.35	1.04	2.41	5.33	4.30	2.23	0.80	3.65	2.29
<b>SAFFLOWER (<i>Carthamus tinctorius</i>)</b>													
PROTEIN CONCENTRATE			3.37	5.65	2.00	1.32	1.50	4.27	2.75	2.57	1.20	4.95	2.22
<b>SESAME SEED (<i>Sesamun indicum</i>)</b>													
FLOUR, DEHULLED SEED	7.68	44.25	3.89	6.92	2.83	2.63	0.69	4.09	3.95	3.69	1.50	5.01	
NONFAT RESIDUAL MEAL		27.00	5.04	7.38	6.37	3.09	4.80	4.92	3.60	4.17	1.31	4.90	2.30
<b>SQUASH (<i>Cucurbita pepo</i>)</b>													
CREOLE NON-ROASTED DEHULLED RAW SEED	5.90	31.46	2.95	5.96	2.99	4.03	2.78	5.54	2.92	2.42	2.83	3.74	1.89
CREOLE RAW SEED	5.78	27.63	3.76	7.23	3.99	5.14	2.81	5.38	3.57	2.57		4.30	1.99
CREOLE ROASTED DEHULLED SEED	1.60	32.19	3.05	6.06	2.98	4.15	2.80	5.35	2.90	2.90	2.17	3.85	1.92
ROUND NON-ROASTED DEHULLED SEED	6.90	31.74	2.81	5.72	2.95	3.78	2.47	5.17	2.83	2.38	2.86	3.55	1.85
ROUND ROASTED DEHULLED SEED	3.60	32.47	2.96	5.80	2.85	3.88	2.44	5.05	2.79	2.36	2.57	3.77	1.84
<b>SOYBEAN (<i>Glicine max</i>)</b>													
DEFATTED FLOUR	7.90	43.96	4.74	7.04	6.13	1.29	2.06	4.61	3.04	3.54	1.78	5.33	2.72
GERMINATED (2 DAYS) DRIED	5.70	42.32	3.94	7.60	6.08	1.27	3.20	5.30	3.79	3.44	1.21	4.78	2.40
INSTANT ATOLE	5.20	20.35	6.80	8.90	5.00	2.20	0.96	5.98	5.20	4.22	1.64	5.58	1.78
RAW BEAN, DEHULLED	4.50	38.50	5.00	8.16	6.31	0.99	0.95	4.92	3.60	3.80	1.39	5.27	2.30
RESIDUAL MEAL	6.30	44.10	4.84	8.21	5.08	1.35	4.22	5.27	3.78	3.66	1.30	4.49	2.30
RESIDUAL MEAL	16.20	40.65	4.57	7.82	3.85	1.11	5.11	4.94	3.66	4.12	1.04	4.68	1.67
SOY "MILK"	87.70	2.90	4.09	7.54	6.46	0.47	0.07	6.30	3.52	3.80	7.48	4.86	2.25
TEXTURIZED	6.35	51.75	4.25	7.07	6.61	1.27	0.49	5.36	3.65	3.83	1.58	5.05	2.75
WHOLE FLOUR	2.20	24.50	4.31	7.11	5.93	2.01	0.78	4.75	3.04	3.78	1.17	4.32	2.07
WHOLE GRAIN		45.00	4.78	8.72	6.26	0.58	1.09	4.82	4.46	8.38	1.35	6.04	2.85
<b>SUNFLOWER (<i>Helianthus annus L.</i>)</b>													
FLOUR	7.20	39.83	4.03	5.69	3.16	2.01	3.56	4.20	1.73	3.58	1.11	4.82	2.02
PASTE		20.60	3.84	2.84	2.56	2.02	6.68	3.32	1.81	2.89	1.20	4.00	1.40
PROTEIN CONCENTRATE	9.10	51.08	4.06	6.02	2.77	2.23	3.50	4.26	2.44	2.84	1.40	5.79	1.71

TABLE 6  
Amino acid content in Mexican foods  
Meats and By-products, Miscellaneous, Tubers, Bulbs and Roots  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>XI. MEATS AND BY-PRODUCTS</b>													
<b>POULTRY</b>													
<b>CHICKEN (<i>Gallus gallus</i>)</b>													
BREAST, BONELESS WITH SKIN	70.00	17.60	4.20	7.00	7.68	3.47	1.25	3.98	3.14	3.88	1.99	4.50	
FLOUR	3.40	50.12	4.30	7.79	4.32	0.61	2.89	4.04	2.29	3.43	0.24	7.10	
LEG, BONELESS WITH SKIN	70.90	14.41	4.09	7.05	7.73	4.25	1.71	3.92	3.10	3.98	2.02	4.22	
THIGH, BONELESS WITHOUT SKIN	63.00	13.13	4.40	7.41	7.93	3.18	1.09	4.01	3.29	4.04	2.06	4.52	
WHOLE, BONELESS WITH SKIN	64.30	14.41	4.30	7.50	6.88	3.45	1.20	4.21	3.37	4.22	1.80	4.43	
<b>SWINE</b>													
FLOUR	1.90	54.99	3.01	6.38	5.47	5.84	0.46	3.37	2.55	3.10	0.55	13.68	
MEAT WITH CHILE CONDIMENT		54.26	3.83	7.02	7.10	1.73	1.12	2.65	2.67	3.93	0.76	4.07	
<b>BOVINE</b>													
DRIED BLOOD		45.51	1.50	9.98	6.89	1.20	1.38	7.10	1.33	4.30	1.03	6.68	
DRIED BLOOD (AVERAGE)		67.51	3.27	6.27	4.23	1.61	5.41	3.58	2.51	3.22	0.27	4.50	
DRIED LIVER	2.90	49.67	4.54	8.75	5.32	2.42	1.52	4.59	3.26	3.80	0.49	5.67	
DRIED LIVER	4.66	38.39	0.54	8.08	6.17	0.52	0.65	4.51	1.83	3.03	0.65	5.85	
DRIED MUSCLE (AVERAGE)		40.11	2.34	4.89	2.85	0.74	3.50	2.89	1.60	2.67	0.26	4.12	
RUMEN FLOUR		5.02	3.09	6.79	4.28	1.30	1.72	6.73	2.21	3.98	2.38	4.73	
<b>XII. MISCELLANEOUS</b>													
BREWER'S MASILLA	2.75	15.99	2.78	6.27	5.54	2.45	0.35	3.13	9.08	3.67	1.14	5.68	
GRENETINE	7.10	81.90	1.26	2.96	3.45	1.57	0.04	1.93	0.73	1.31	0.02	2.34	
POLLEN	7.50	16.50	4.02	6.70	5.54	1.88	0.57	3.89	2.72	2.78	0.64	5.55	
SODIUM CASEINATE	5.00	86.13	4.56	8.57	6.91	0.48	0.75	4.91	5.23	3.82	0.78	5.22	
<b>XIII TUBERS, BULBS AND ROOTS</b>													
<b>YUCCA</b>													
NONFAT SEED			4.47	6.38	4.92	1.61	1.90	4.36	5.45	3.54	1.10	6.15	
SEED (PROTEIN)	5.30	61.56	5.24	7.64	5.09	2.73	3.19	4.69	3.82	4.28	0.80	6.24	

TABLE 7  
Amino acid content in mexican food  
Vegetables, Yeast  
(g per 16 g of nitrogen)

FOOD	MOISTURE g/100g product	CRUDE PROTEIN g/100g product	ILE	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	HIS
<b>XIV. VEGETABLES</b>													
<b>ALFALFA (<i>Medicago sativa</i>)</b>													
DRIED		38.25	2.60	7.46	4.41	0.45	2.27	3.21	2.33	2.52	0.21	3.27	2.31
TABLET	7.72	10.31	4.49	8.38	4.98	1.01	2.12	5.18	3.40	5.12	0.60	4.72	1.89
<b>BEET (<i>Beta vulgaris</i>)</b>													
RAW	87.88	1.92	2.02	1.23	1.17	0.43	0.68	1.67	1.10	1.17	0.16	1.84	0.69
<b>BROCCOLI (<i>Brassica oleracea</i>)</b>													
RAW	85.70	3.92	2.63	4.23	3.94	0.74	1.05	3.10	1.86	2.64	1.03	3.71	1.57
<b>NOPAL CACTUS (<i>Opuntia sp.</i>)</b>													
RAW STALK	91.63	1.37	2.82	5.17	4.37	1.10	1.23	4.09	10.97	2.89	0.89	3.97	1.76
<b>QUELITE (<i>Amaranthus chlorostachys</i>)</b>													
AMARANTH'S LEAVES	86.00	4.36	3.10	5.58	3.61	1.92	1.60	3.00	2.01	2.70	0.17	3.79	1.49
<b>MEZQUITE (<i>Prosopis juliflora</i>)</b>													
PULP			3.41	9.64	4.78	1.23	2.38	3.24	3.28	3.06	1.78	6.47	1.71
WHOLE POD	67.13	22.71	3.25	7.17	4.60	1.23	3.08	3.62	2.95	2.76	1.12	5.34	1.82
QUIOTE ( <i>Agave spp.</i> )	91.00	0.82	4.42	6.76	5.01	1.05	3.07	4.42	3.11	2.69	1.11	4.86	2.66
<b>XV. YEAST</b>													
<b>BREWER'S (<i>S. cerevisiae</i>)</b>													
YEAST	3.30	46.51	4.10	6.20	5.02	1.09		3.47		3.92	1.00	4.56	4.38
YEAST	6.80	35.92	4.61	7.51	7.51	3.58	1.99	4.04	3.47	4.61	1.14	4.61	2.33
YEAST	5.60	33.47	5.43	7.04	3.70	2.24	2.75	4.59	1.21	3.26	0.98	6.53	2.01
YEAST	3.20	45.46	3.66	8.10	8.39	1.46	2.82	3.26	2.75	3.49	0.81	4.63	2.07

Note: If you need information about the others amino acids please contact in e-mail: [foods@quetzal.innsz.mx](mailto:foods@quetzal.innsz.mx)

## Contenido total y disponibilidad *in vitro* de hierro y zinc en alimentos de mayor consumo en Sonora y Oaxaca, México

Rosa Olivia Méndez, Karla Bueno, Nayeli Campos, Daniela López, Carolyn Jane Wyatt y María Isabel Ortega

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México

**RESUMEN.** La dieta en países en vías de desarrollo está constituida por cereales y legumbres que si bien aportan cantidades importantes de hierro (Fe) y zinc (Zn), resultan ser minerales de baja disponibilidad. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) cuantificar el contenido total y dializable de Fe y Zn en alimentos del norte (Sonora) y del sur (Oaxaca) de México; 2) evaluar el efecto de la presencia de carne sobre los valores de Fe y Zn dializables. La cuantificación de Fe y Zn total y dializable se hizo por el método de la AOAC y de Shen et al, respectivamente. Los resultados obtenidos para Fe total en alimentos de Sonora presentaron un rango de  $0.78 \pm 0.0$  a  $11.59 \pm 0.03$  mg/100g (base seca, BS); y en los de Oaxaca de  $0.86 \pm 0.18$  a  $8.8 \pm 0.57$  mg/100g (BS). Para Zn total los valores variaron de  $0.91 \pm 0.00$  a  $13.58 \pm 0.05$  mg/100g (BS) en Sonora y de  $0.64 \pm 0.18$  a  $20.80 \pm 0.33$  mg/100g (BS) en Oaxaca. En los alimentos de Sonora se tuvieron valores de  $0.1 \pm 0.04\%$  a  $10.6 \pm 0.36\%$  para Fe dializable y de  $4.0 \pm 0.21\%$  a  $55.32 \pm 0.14\%$  para Zn dializable. En los de Oaxaca el rango fue de  $0.22 \pm 0.06\%$  a  $9.40 \pm 0.14\%$  para Fe dializable y de  $2.41 \pm 0.26\%$  a  $54.27 \pm 1.49\%$  para Zn dializable. Se obtuvo un promedio mayor en el contenido de Fe dializable en los alimentos que contenían carne, respecto a los que no la contenían y entre el frijol pinto y las tortillas de maíz de Sonora respecto al frijol negro y tortillas de maíz rurales de Oaxaca. El contenido de Zn dializable no mostró diferencias significativas entre los alimentos de las dos regiones.

**Palabras clave:** Disponibilidad *in vitro*, dializable, hierro, zinc.

### INTRODUCCION

El Fe y el Zn son minerales indispensables para los seres humanos. Durante la niñez la deficiencia de Fe se asocia con disminución en la capacidad de aprendizaje y el desarrollo motor, mientras que la deficiencia de Zn con retardo en el crecimiento y aumento en la prevalencia de enfermedades infecciosas (1). Las recomendaciones de consumo diario para Fe y Zn varían con la edad y el sexo, pero es importante considerar que algunos factores dietarios pueden afectar su absorción intestinal y dar como resultado una baja absorción de ambos minerales. En países en vías de desarrollo se ha reportado que los principales aportadores de Fe y Zn son alimentos de origen vegetal, los cuales abastecen también cantidades importantes de fibra, taninos y fitatos que pueden

**SUMMARY.** Total content and dialyzable iron and zinc in foods from Northern and Southern Mexico. Developing countries diets are based on a variety of plant foods that often are the main suppliers of important amounts of iron (Fe) and zinc (Zn). The objectives of this study were 1) to measure the total and dialyzable amounts of Fe and Zn in foods from Northern Mexico (Sonora) and from Southern Mexico (Oaxaca) and 2) to evaluate the effect of meat content of diets on the dialyzable amount of Fe and Zn. Methods to calculate the total dialyzable amount of Fe and Zn, were those of the AOAC and of Shen et al. Total Fe in e northern Mexican foods went from  $0.78 \pm 0.0$  to  $11.59 \pm 0.03$  mg/100g (dry weight, DW); in southern Mexican foods the same micronutrient amounts were  $0.86 \pm 0.18$  to  $8.8 \pm 0.57$  mg/100g (BS). Total Zn values were  $0.91 \pm 0.00$  to  $13.58 \pm 0.05$  mg/100g (DW) in Sonora, and  $0.64 \pm 0.18$  to  $20.80 \pm 0.33$  mg/100g (DW) in Oaxaca. In northern Mexico, foods dialyzable Fe had values from  $0.1 \pm 0.04\%$  to  $10.6 \pm 0.36\%$  and for Zn from  $4.0 \pm 0.21\%$  to  $55.32 \pm 0.14\%$ . Meanwhile, the range of values of dialyzable Fe for foods from Oaxaca were from  $0.22 \pm 0.06\%$  to  $9.40 \pm 0.14\%$  for and from  $2.41 \pm 0.26\%$  to  $54.27 \pm 1.49\%$  for dialyzable Zn. The average value for dialyzable Fe was higher in the foods that contained meat or meat products ( $p= 0.001$ ).

**Key words:** *In vitro* bioavailability, dialyzable, iron, zinc

actuar de manera negativa en la absorción de Fe no hémico y Zn (2). De acuerdo a Zimmermann et al (3) una de las causas de deficiencia de Fe en niños de una área rural de África puede ser la baja disponibilidad del Fe contenido en su dieta, basada en cereales y leguminosas. La misma situación es de esperarse en cuanto al Zn considerando que su absorción está determinada por la cantidad de fitatos y de Zn total en los alimentos (4). Por otra parte, resultados obtenidos con alimentos fortificados y con suplementos sugieren que es importante evitar interferencias entre el Fe y el Zn durante el proceso de absorción intestinal. Crofton et al (5) concluyeron que el Zn inorgánico puede disminuir la absorción intestinal del Fe cuando es coadministrado en proporciones molares de 1:1 o 2.5:1, Zn-Fe. Sin embargo, Herman et al (6) reportaron que al utilizar una proporción 1:1, Zn-Fe, la absorción de Fe

se afectó solo cuando usaron sulfato de zinc como fortificante en pan de trigo y no cuando utilizaron óxido de zinc. Respecto a la posible inhibición que el Fe no heme pudiera tener sobre la absorción del Zn, Solomons y Jacob (7) reportaron evidencias de interacción competitiva en el intestino humano al comparar los niveles de Zn plasmático después de administrar Zn y Zn con Fe. Sus resultados mostraron valores más altos de Zn plasmático cuando el Zn se administró solo y menores conforme aumentaba la cantidad de Fe no heme. Por lo tanto, el tipo de sales y la proporción entre Fe y Zn son dos de las recomendaciones a seguir durante la formulación de productos fortificados.

Entre los métodos más exactos usados para evaluar la biodisponibilidad de Fe y Zn se citan los que utilizan isótopos, los cuales también permiten medir la velocidad de absorción gastrointestinal y la excreción endógena hacia el tracto gastrointestinal, entre otros parámetros. Sin embargo una limitante para su utilización es su elevado costo y el tiempo requerido para la realización de esos estudios. Como métodos relativamente sencillos, rápidos y menos caros se citan técnicas *in vitro* que si bien no reflejan la utilización de los minerales, sí sirven para estimar la cantidad de Fe y Zn absorbidos durante la digestión intestinal. Shen et al (8) publicaron un método *in vitro* para estimar la disponibilidad de minerales simulando una digestión gastrointestinal. La proporción de los compuestos que se difunden a través de la membrana semipermeable durante la fase intestinal se usa como medida de la disponibilidad del elemento y se les denomina "dializables". Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) cuantificar el contenido total y dializable de Fe y Zn en alimentos de Sonora y Oaxaca; 2) evaluar el efecto de la presencia de carne sobre los valores de Fe y Zn dializables en los alimentos.

## MATERIALES Y METODOS

**Selección de Alimentos.** En un listado de alimentos obtenido de un estudio previo en nuestro centro de trabajo (9) se identificaron los alimentos aportadores de Fe y Zn a la dieta de Sonora. Los de mayor consumo fueron: leche, huevo, queso fresco, salchicha, mortadela, jamón, carne molida, carne de cocer, cazón, frijol, tortillas de maíz y tortillas de harina de trigo. En Oaxaca se seleccionaron: pan sierra, pan amarillo, pan yemá, pan rebosado, pan telera y bolillo, tamal de mole con pollo, tamal de amarilló con pollo, tamal de frijol, tortillas de maíz rurales, tortillas de maíz urbanas, caldo de res, pozole de pollo, entomatadas, barbacoa de chivo, albóndigas, enchiladas, amarillo de pollo, ejotes con huevo, sopa de guías, sopa de pasta con menudencias, frijoles negros, tlayudas, tasajo, chorizo de puerco, quesillo y queso fresco. Estos alimentos se compraron ya preparados en su lugar de origen y

se transportaron congelados vía aérea hasta nuestro centro.

**Preparación de las Muestras.** Todas las muestras se homogenizaron en una licuadora Waring Comercial Blendor (Waring Products Corporation of America, New Hartford, Connecticut 060557). Se tomó una fracción de la muestra para determinar el contenido de humedad de acuerdo al método de la AOAC, Sec 925.09 (10) utilizando una estufa para vacío VWR 1430 (VWR Scientific Inc., Philadelphia, PA 19101-3645). El resto de la muestra se secó a 50°C en una estufa BLUE MC-4850-Q (Blue M. Blue Island, IL).

**Cuantificación de Fe y Zn.** La digestión térmica de las muestras se realizó en un horno de microondas (CEM, MDS 2000, Falcon Instruments, México, DF) siguiendo la metodología reportada en el manual de aplicaciones de CEM (11). La cuantificación del Fe y del Zn se realizó según el método de la AOAC sección 968.08 (10), utilizando un espectrómetro de absorción atómica (SpectrAA-20 Varian Techntron Pty Limited, Mulgrave Victoria, Australia) y siguiendo las recomendaciones de operación indicadas en el manual del equipo para Fe y Zn.

**Disponibilidad *in vitro*.** Se determinó mediante la técnica modificada por Shen et al (8), la cual consiste en una digestión físico-enzimática que asemeja condiciones gastrointestinales. En general, a las muestras secas y desgrasadas se les agregó agua deionizada, se les ajustó el pH a 2 y se les agregó pepsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se mantuvieron durante dos horas a 37°C en un baño con agitación. Posteriormente se tomó una porción de la muestra, se le agregó extracto de bilis-pancreatina y se continuó la digestión en presencia de la membrana de diálisis (Spectra Por, 12-14 000 MW, VWR, South Plainfield, NJ). Una vez obtenido el dializado se cuantificó su contenido de Fe y Zn utilizando absorción atómica (AOAC, sección 968.08)(10) y se aplicó la fórmula reportada por Shen et al (8) para calcular la cantidad dializable de cada mineral.

**Análisis Estadístico.** Las mediciones realizadas en los alimentos se hicieron por triplicado. El análisis de los datos (promedios, desviación estándar, prueba t- student, y análisis de correlación de Spearman) se hizo en el paquete estadístico NCSS60 (12).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La validación del método de cuantificación de Fe y Zn total se realizó utilizando hígado de bovino (Bovine Liver 1577b NIST, Gaithersburg, MD 20899). El valor obtenido para Fe fue de  $188.6 \pm 7$  ppm con un coeficiente de variación (CV) de 3.79% y un porcentaje de recuperación de 102.5%. El valor certificado para Fe es  $184 \pm 15$  ppm. Para Zn el valor obtenido fue  $122 \pm 3$  ppm, con un CV de 2.58% y un porcentaje de recuperación de 95.24%. El valor certificado es  $127 \pm 16$  ppm.

El contenido total de Fe y Zn en los alimentos seleccionados de Sonora y de Oaxaca se muestra en las Tablas 1 y 2, respectivamente. El rango de valores de Fe en los alimentos de Sonora fue de  $0.78 \pm 0.0$  a  $11.59 \pm 0.03$  mg/100g (base seca, BS); y en los de Oaxaca de  $0.86 \pm 0.02$  a  $8.8 \pm 0.05$  (BS), sin diferencia estadística significativa entre el promedio de la totalidad de alimentos de Sonora y el promedio de la totalidad de alimentos de Oaxaca. Para Zn, los valores variaron de  $0.91 \pm 0.00$  a  $13.58 \pm 0.05$  mg/100g (BS) en Sonora y de  $0.69 \pm 0.01$  a  $19.06 \pm 0.03$  (mg/100 g, BS) en Oaxaca, sin diferencia estadística significativa entre el promedio de la totalidad de alimentos de Sonora y el promedio de la totalidad de los alimentos de Oaxaca.

TABLA 1

Contenido total de Fe y Zn en alimentos de Sonora, México. Base Seca (mg/100 g)

Alimento	Fe total <sup>1</sup>	Zn total <sup>1</sup>
Frijol cocido	$5.72 \pm 0.00$	$2.43 \pm 0.01$
Tortilla de maíz	$2.62 \pm 0.01$	$2.21 \pm 0.01$
Tortilla de harina de trigo	$3.17 \pm 0.02$	$0.91 \pm 0.00$
Carne molida	$6.27 \pm 0.56$	$11.58 \pm 0.38$
Carne de cocer	$3.74 \pm 0.04$	$13.58 \pm 0.05$
Jamón	$11.59 \pm 0.03$	$4.39 \pm 0.03$
Mortadela	$4.74 \pm 0.44$	$3.42 \pm 0.16$
Salchicha	$4.18 \pm 0.28$	$3.52 \pm 0.07$
Huevo blanco	$6.11 \pm 0.01$	$6.11 \pm 0.01$
Cazón	$2.50 \pm 0.13$	$1.39 \pm 0.00$
Leche de vaca	$0.78 \pm 0.00$	$3.31 \pm 0.03$
Queso fresco regional	$1.10 \pm 0.01$	$7.10 \pm 0.07$

<sup>1</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar

En base a las cantidades y frecuencia de consumo, tanto en Sonora como en Oaxaca las tortillas de maíz y el frijol son de los principales alimentos aportadores de Fe y Zn, sin embargo es importante puntualizar que en Sonora se consume frijol pinto mientras que en Oaxaca se consume frijol negro. El contenido de Fe y Zn para el frijol pinto cocido es de  $5.72 \pm 0.00$  y  $2.43 \pm 0.01$  mg/100g (BS), respectivamente (Tabla 1). En frijol negro los valores son de  $6.36 \pm 0.04$  y  $2.65 \pm 0.05$  mg/100g (BS), para los mismos minerales (Tabla 2).

En cuanto a las tortillas de maíz, en la zona serrana de Oaxaca persiste la costumbre de nixtamalizar el maíz a nivel doméstico para su posterior uso en la elaboración de tortillas (tortillas de maíz rurales). En la zona urbana, la elaboración de tortillas se realiza con una mezcla de harina de maíz procesada industrialmente y maíz nixtamalizado de manera doméstica. En Sonora, las tortillas de maíz a nivel comercial son elaboradas únicamente con harina procesada industrialmente. Por esta diferencia y considerando que la harina de maíz pro-

cesada industrialmente está fortificada con Fe y Zn podríamos esperar que las tortillas de maíz de Sonora presenten promedios mayores en el contenido total de ambos minerales. Sin embargo, los resultados de la Tabla 1 no muestran diferencias significativas entre los datos de las tortillas de maíz de Sonora ( $2.62 \pm 0.01$ , mg/100g para Fe y  $2.21 \pm 0.01$  mg/100g para Zn) y las de Oaxaca ( $1.58 \pm 0.03$  mg/100g de Fe y  $1.75 \pm 0.02$  mg/100 g para Zn en las tortillas de maíz urbanas y  $1.45 \pm 0.45$  mg/100 g para Fe y  $1.97 \pm 0.01$  mg/100g de Zn en las tortillas rurales), Tabla 2.

TABLA 2

Contenido total de Fe y Zn en alimentos de Oaxaca, México. Base seca. (mg/100 g).

Alimento	Fe total <sup>1</sup>	Zn total <sup>1</sup>
<b>Panes</b>		
Sierra	$2.31 \pm 0.02$	$1.48 \pm 0.00$
Amarillo	$4.26 \pm 0.02$	$0.69 \pm 0.01$
Yema	$1.79 \pm 0.03$	$1.18 \pm 0.06$
Rebosado	$1.94 \pm 0.13$	$0.66 \pm 0.55$
Telera y Bolillo	$4.55 \pm 0.01$	$0.64 \pm 0.02$
<b>Tortillas de maíz</b>		
Urbanas	$1.58 \pm 0.03$	$1.75 \pm 0.02$
Rurales	$1.45 \pm 0.45$	$1.97 \pm 0.01$
Tlayudas	$2.04 \pm 0.01$	$1.92 \pm 0.01$
<b>Alimentos varios</b>		
Chorizo de puerco	$3.32 \pm 0.01$	$2.06 \pm 0.05$
Quesillo	$1.14 \pm 0.06$	$3.20 \pm 0.03$
Queso fresco	$0.86 \pm 0.02$	$3.03 \pm 0.02$
Frijol negro	$6.36 \pm 0.04$	$2.65 \pm 0.05$
<b>Tamales</b>		
Mole	$5.43 \pm 0.07$	$1.17 \pm 0.03$
Amarillo	$3.80 \pm 0.26$	$1.91 \pm 0.01$
Frijol	$4.64 \pm 0.01$	$2.01 \pm 0.07$
<b>Guisados</b>		
Ejotes con huevo	$7.45 \pm 0.10$	$4.03 \pm 0.05$
Amarillo de pollo	$4.77 \pm 0.01$	$1.89 \pm 0.03$
Caldo de res	$4.63 \pm 0.06$	$6.52 \pm 0.26$
Pozole de pollo	$4.92 \pm 0.01$	$1.90 \pm 0.02$
Entomatadas	$4.56 \pm 0.23$	$1.80 \pm 0.01$
Barbacoa de chivo	$8.88 \pm 0.05$	$19.06 \pm 0.03$
Albóndigas	$3.83 \pm 0.05$	$3.61 \pm 0.00$
Enchiladas	$2.27 \pm 0.05$	$1.34 \pm 0.03$
Sopa pasta con menudencias	$7.81 \pm 0.15$	$4.65 \pm 0.02$
Sopa de guías	$7.51 \pm 0.23$	$3.78 \pm 0.05$
Tasajo	$2.85 \pm 0.03$	$8.37 \pm 0.17$

<sup>1</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar

Considerando que la definición de biodisponibilidad incluye digestión, solubilidad, absorción e incorporación de los nutrientes en los procesos metabólicos, es comprensible que resulte imposible medir la biodisponibilidad de los minerales

mediante métodos *in vitro*. Por lo tanto, y partiendo de que posiblemente la digestión y la solubilidad sean los únicos eventos independientes de controles hormonales y nutricionales, la cuantificación de minerales dializables se considera una medida predictora de tendencias y representa una medida aproximada de la cantidad disponible para absorción (13). Wyatt et al (14) cuantificaron calcio y fósforo dializable en dietas mexicanas y mostraron las mismas tendencias que al evaluar el efecto de las dietas sobre la composición y el crecimiento del fémur de ratas. Luten et al (15) midieron el Fe dializable en tres platillos diferentes y concluyeron que a pesar de que la repetibilidad de las determinaciones varió considerablemente, el método es aceptable ya que los resultados fueron semejantes a los obtenidos en un estudio *in vivo*. Bosscher et al (16) publicaron que el método *in vitro* basado en la cuantificación de elementos dializados después de simular el proceso de digestión gastrointestinal, es adecuado para predecir la disponibilidad de calcio, Fe y Zn en alimentos infantiles. Pérez-Llamas et al (17) reportaron que este método fue útil para investigar la influencia de diferentes tipos de proteínas sobre la disponibilidad de Fe y Zn.

La Tabla 3 presenta los resultados obtenidos para Fe y Zn dializable en alimentos de Sonora y en la Tabla 4 los que corresponden a alimentos de Oaxaca. El promedio de Fe dializable de la totalidad de los alimentos de Sonora se comparó con el promedio de la totalidad de los alimentos de Oaxaca sin mostrar diferencia estadística significativa. Pero considerando que el frijol y las tortillas de maíz son de los principales alimentos aportadores de Fe y Zn en las dietas de Sonora y Oaxaca procedimos a comparar sus contenidos dializables, sin encontrar diferencia significativa entre el contenido de Fe dializable de las tortillas de maíz de Sonora ( $2.2 \pm 0.66\%$ ) y las de la zona urbana de Oaxaca ( $0.66 \pm 0.04\%$ ). Al hacer la comparación entre el contenido de Fe dializable del frijol de Sonora con el del frijol negro de Oaxaca se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.0003$ ), al igual que entre las tortillas de maíz de Sonora y las rurales de Oaxaca,  $p = 0.016$  ( $1.02 \pm 0.09\%$  para el frijol negro de Oaxaca,  $2.34 \pm 0.05\%$  para frijol de Sonora,  $0.46 \pm 0.02\%$ , para las tortillas de maíz rurales de Oaxaca y  $2.2 \pm 0.66\%$  para tortillas de maíz de Sonora). El contenido de Fe dializable de las tortillas de maíz rurales y las urbanas de Oaxaca fue significativamente diferente ( $p = 0.004$ ). El contenido de Fe dializable del frijol de Oaxaca corresponde a un 43% del de Sonora. Este hecho, aunado a un menor consumo de alimentos aportadores de Fe en Oaxaca podría ser una explicación de la diferencia en la prevalencia de anemia por deficiencia de Fe entre los niños de Oaxaca y Sonora (18).

Respecto al Zn consideramos que es necesario observar las diferencias en el consumo total de los alimentos entre las dos poblaciones estudiadas, ya que la comparación del contenido dializable entre los principales alimentos aportadores de

las dietas de Sonora y Oaxaca no mostró diferencias significativas ( $17.29 \pm 0.07\%$  de Zn dializable en el frijol de Oaxaca y  $23.48 \pm 2.33\%$  en el de Sonora;  $9.55 \pm 0.27$  y  $6.89 \pm 0.22\%$  para las tortillas de maíz urbanas y rurales de Oaxaca y  $8.0 \pm 0.14\%$  en las de Sonora). La diferencia entre el contenido de Zn dializable de las tortillas urbanas y las rurales de Oaxaca fue significativa ( $p = 0.008$ ).

TABLA 3

Contenido de Fe y Zn dializable en alimentos de Sonora (%)

Alimento	Fe dializable <sup>1</sup>	Zn dializable <sup>1</sup>
Frijol cocido	$2.34 \pm 0.05$	$23.48 \pm 2.33$
Tortilla de maíz	$2.2 \pm 0.66$	$8 \pm 1.01$
Tortilla de harina de trigo	$2.8 \pm 0.16$	$8.8 \pm 1.52$
Jamón	$3.25 \pm 0.07$	$18.85 \pm 1.49$
Mortadela	$1.25 \pm 0.15$	$5.4 \pm 0.51$
Salchicha	$3.85 \pm 0.61$	$18.05 \pm 1.99$
Huevo blanco	$0.1 \pm 0.04$	$10 \pm 0.99$
Cazón	$5.7 \pm 0.04$	$4 \pm 0.21$
Leche de vaca	$5.2 \pm 0.43$	$16.9 \pm 0.08$
Queso fresco regional	$0.7 \pm 0.14$	$15 \pm 1.59$
Carne de res frita (molida)	$8.0 \pm 0.14$	$55.32 \pm 0.14$
Carne de res cocida	$10.6 \pm 0.36$	$34.87 \pm 1.86$

<sup>1</sup>Media  $\pm$  Desviación estándar

En mujeres del norte de México en edad reproductiva el consumo de Fe es de 12 a 17 mg diarios y el de Zn de 1.6 mg (19). El promedio de consumo estimado de tortilla de maíz y de tortilla de harina de trigo, de 150 mujeres en edad reproductiva de la misma región, fue de 94 y 82 g/día, mientras que el de frijol fue de 147 g diarios (19). En base a esos consumos se calculó un aporte de 1.24, 1.85 y 3.3 mg de Fe y 1.04, 0.53 y 1.4 mg de Zn a partir de la tortilla de maíz, tortilla de harina de trigo y frijol, respectivamente. La cantidad de Fe aportado por ambas tortillas y por el frijol (6.39 mg) corresponde a un 44% del Fe total de la dieta de las mujeres. De igual manera, los mismos alimentos aportan el 25.6% del Zn dietario (2.97 mg). Considerando los datos de Fe y Zn dializable de la Tabla 3 calculamos valores de 0.03, 0.05 y 0.08 mg de Fe dializable y 0.08, 0.05 y 0.33 mg de Zn dializable de tortillas de maíz, tortilla de harina de trigo y frijol, respectivamente. De esta forma podemos observar que de los 6.39 mg de Fe aportados por ambas tortillas y por el frijol, solo 0.16 mg están disponibles para absorción, mientras que de los 2.97 mg de Zn aportados por los mismos alimentos solo están disponibles 0.46 mg. Estos resultados apoyan la observación de que cubrir la recomendación de consumo diario de Fe y Zn a partir de los alimentos analizados podría ser insuficiente para reemplazar las pérdidas obligatorias de los adultos, dada su baja disponibilidad.

En leche de vaca, Stekel et al (20) reportaron valores que

varían entre 2.9 y 5.1% para Fe dializable en fórmulas lácteas para niños. En nuestro trabajo el resultado fue de  $5.2 \pm 0.43\%$  (Tabla 3). Para Zn disponible, los valores reportados varían desde un 6% hasta un  $49.5 \pm 18.5\%$  dependiendo de la técnica y del modelo experimental utilizado (8, 21-23). En nuestro estudio el valor obtenido fue de  $16.9 \pm 0.08\%$ .

**TABLA 4**  
Contenido de Fe y Zn dializable en alimentos de Oaxaca, México (%)

Alimento	Fe dializable <sup>1</sup>	Zn dializable <sup>1</sup>
<b>Panes</b>		
Sierra	$0.22 \pm 0.06$	$7.16 \pm 0.02$
Amarillo	$1.82 \pm 0.08$	$6.64 \pm 0.19$
Yema	$0.53 \pm 0.07$	$2.61 \pm 0.11$
Rebosado	$2.16 \pm 0.03$	$6.30 \pm 0.28$
Telera y Bolillo	$0.97 \pm 0.01$	$2.41 \pm 0.26$
<b>Tortillas de maíz</b>		
Urbanas	$0.66 \pm 0.04$	$9.55 \pm 0.27$
Rurales	$0.46 \pm 0.02$	$6.89 \pm 0.22$
Tlayudas	$0.67 \pm 0.01$	$7.39 \pm 0.14$
<b>Alimentos varios</b>		
Chorizo de puerco	$6.34 \pm 0.05$	$31.68 \pm 1.46$
Quesillo	$5.94 \pm 0.11$	$45.97 \pm 0.95$
Queso fresco	$6.62 \pm 0.10$	$54.27 \pm 1.49$
Frijol negro	$1.02 \pm 0.09$	$17.29 \pm 0.07$
<b>Tamales</b>		
Mole	$2.68 \pm 0.08$	$4.97 \pm 0.47$
Amarillo	$1.31 \pm 0.15$	$7.37 \pm 0.88$
Frijol	$1.67 \pm 0.20$	$15.65 \pm 1.22$
<b>Guisados</b>		
Ejotes con huevo	$0.88 \pm 0.01$	$16.95 \pm 0.32$
Amarillo de pollo	$3.02 \pm 0.37$	$41.37 \pm 0.07$
Caldo de res	$7.41 \pm 0.09$	$31.91 \pm 0.42$
Pozole de pollo	$5.69 \pm 0.28$	$26.17 \pm 0.05$
Entomatadas	$2.68 \pm 0.33$	$20.26 \pm 0.12$
Barbacoa de chivo	$2.52 \pm 0.11$	$16.86 \pm 0.98$
Albóndigas	$3.67 \pm 0.07$	$32.81 \pm 0.22$
Enchiladas	$3.25 \pm 0.17$	$30.88 \pm 0.07$
Sopa past. mend.	$2.25 \pm 0.08$	$27.63 \pm 0.06$
Sopa de guías	$3.62 \pm 0.34$	$35.75 \pm 2.03$
Tasajo	$9.40 \pm 0.14$	$23.88 \pm 0.28$

<sup>1</sup>Media  $\pm$  Desviación estándar

De acuerdo a Monsen (24) la disponibilidad del Fe hemínico varía de un 15 a un 35% y la del no hemínico del 2 al 20%. Para 25 dietas comúnmente consumidas en Estados Unidos, Reddy et al (25) reportaron valores de disponibilidad de Fe entre 1.2 y 19.7%. En nuestro estudio, el Fe dializable fue de  $9.40 \pm 0.14$  en carne de res de Oaxaca (tasajo) y de  $8 \pm 0.14\%$  en carne de res frita (molida) de Sonora, mientras que

el Zn fue de  $23.88 \pm 0.28$  y de  $55.32 \pm 0.14\%$  en las mismas muestras.

Al comparar los contenidos dializables de ambos minerales entre los alimentos que contenían carne y los que no la contenían el promedio fue mayor y significativamente diferente para Fe dializable en los alimentos que contenían carne ( $p=0.001$ ). El efecto favorecedor de la carne (de res, pollo, pescado, puerco, etc) sobre la absorción del Fe ha sido ampliamente estudiado (13). Baech et al (26) sugieren que las proteínas de alto peso molecular contenidas en la carne tienden a polimerizarse a temperaturas elevadas, y que dichos polímeros afectan de manera positiva la absorción del Fe no heme, sin embargo consideran que esta hipótesis necesita más investigación. Hurrell et al (27) consideran la posibilidad de que el efecto favorecedor de la carne sobre la absorción del Fe sea a través de algún mecanismo fisiológico como por ejemplo la estimulación de secreciones intestinales.

Respecto a la interferencia en la absorción de un mineral por efecto de otro mineral, los reportes referidos a Fe y Zn son controversiales. Flanagan et al (28), Rosander-Hulten et al (29) y Dijkhuizen et al (30) sostienen que el Fe y el Zn no presentan interacciones competitivas para su absorción. Sin embargo, Monsen (24) y Sandstrom (31) señalaron que dichos minerales sí compiten, de tal manera que es posible encontrar un efecto negativo de la absorción de uno sobre el otro. Goddard et al (32) y Herman et al (6) publicaron que el Zn tiene un efecto negativo sobre la absorción del Fe, mientras que Solomons y Jacob (7), Solomons (33) y Linder (2) publicaron que una elevada cantidad de Fe no heme inhibe la absorción de iones de Zn. En el presente trabajo los resultados del total de los alimentos mostraron una relación negativa entre el contenido de Fe total y el porcentaje de Zn dializable ( $r = -0.37$ ;  $p = 0.02$ ).

Este estudio muestra que a pesar de que las dietas mexicanas contienen diferentes variedades de frijol y diferentes tipos de cereales (maíz y trigo) no presentan diferencias significativas en las cantidades totales de Fe y Zn. Al analizar los datos de los principales alimentos aportadores de Fe y Zn (tortillas y frijoles) se estimó una mayor disponibilidad de Fe en los alimentos del norte del país.

Diversos estudios han reportado que la presencia de alimentos de origen animal en la dieta favorece el crecimiento de los niños y que esto puede deberse a un mayor aporte de micronutrientes en sus dietas (34,35). Si bien la cantidad de Zn dializable no fue diferente entre los alimentos de consumo más frecuente de Sonora y Oaxaca, las diferencias en Fe dializable en las dietas sonorenses puede significar, en conjunto con la presencia de alimentos de origen animal, un mejor desarrollo psicomotor de los niños del norte de México. En el caso del crecimiento físico no podemos aseverar que la diferencia en la disponibilidad del Fe de la dieta del norte de México esté asociada al crecimiento de los niños

sonorenses ya que según Allen (34), el papel del Fe en el crecimiento físico se ha observado de forma contradictoria en un buen número de estudios.

Finalmente y atendiendo a que la composición de la dieta puede afectar la absorción de los minerales, se recomienda que la medición de la disponibilidad de Fe y Zn se realice de acuerdo a la composición total o integral de las dietas regionales para que los resultados reflejen el efecto conjunto de los inhibidores y de los favorecedores de la absorción.

## REFERENCIAS

- Sizer F and Whitney E. Nutrition concepts and controversies. 6<sup>th</sup> edition. St. Paul: West Publishing Company; 1994:282-288
- Linder MC. Nutrition and metabolism of the trace elements. En: Linder, M.C. editors. Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Applications. Appleton & Lange; 1991; pp. 216-270.
- Zimmermann MB, Chaouki N, and Hurrell RF. Iron deficiency due to consumption of a habitual diet low in bioavailable iron: a longitudinal cohort study in Moroccan children. 2005;81:115-21.
- Sandström B. Bioavailability of zinc. European J Clin Nutr 1997; 51 (1): S17-S19.
- Crofton RW, Gvozdanovic O, Gvozdanovic S, Khin Ch, Brunt PW, Mowat NA, and Aggett P. Inorganic zinc and the intestinal absorption of ferrous iron. Am J Clin Nutr 1989;50:141-4.
- Herman S, Griffin IJ, Suwanti S, Ernawati F, Permaesih D, Pambudi D, and Abrams SA. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in Indonesian children. Am J Clin Nutr 2002; 76(4): 813-817.
- Solomons NW, and Jacob RA. Studies on the bioavailability of zinc in humans: effects of heme and non heme iron on the absorption of zinc. Am J Clin Nutr 1981;34:475-482.
- Shen L, Robberecht H, Van Dael P, and Deelstra H. Estimation of the bioavailability of zinc and calcium from human, cow's, goat, and sheep milk by an in vitro method. Biological Trace Element Research 1995;49: 107-118.
- Quizán PT, y Ortega I. Diseño y validación de una herramienta para identificar riesgo dietario en mujeres adultas de bajo ingreso. Nutr Clin 2000; 3(4): 128-135.
- AOAC. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, 5th ed.; Helrich K, ed; AOAC: Washington, DC.1995
- CEM. Applications Manual. Microwave Sample Preparation System. CEM Corporation. USA 1991.
- NCSS 60. Statistical System for Windows. Number Cruncher Statistical System. Kaysville, Utah. 1997.
- Hurrell RF. Bioavailability of iron. Eur J Clin Nutr 1997;51 S1:S4-S8.
- Wyatt CJ, Hernández ME, Méndez RO, and Valencia M. Effect of different calcium and phosphorus content in Mexican diets on rat femur bone growth and composition. Nutr Res 2000; 20 (3):427-437.
- Luten J, Crews H, Flynn A, Dael P, Kastenmayer P, Hurrell R, Deelstra H, Shen L, Fairweather-Tait S, Hickson K, Farré R, Schlemmer U, Frohlich W. Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. J Sci Food Agric 1996; 72:415-24.
- Bosscher D, Lu I, Van Cauwenbergh R, Van Caillie-Bertrand M, Robberecht H, and Deelstra H. A method for in vitro determination of calcium, iron and zinc availability from first-age infant formula and human mi/k. Int. J Food Sci Nutr 2001; 52 (2): 173-182.
- Pérez-Llamas F, Diepenmaat-Wolters MGE, and Iamora S. Influence of different types of protein on in vitro availability of intrinsic and extrinsic iron and zinc. J Sci Food Agric 1997;75:303-311.
- Wyatt CJ, Valencia ME, Triana MA. Iron deficiency in children in México: A contrasting situation. Recent Res Devel Agr Food Chem 2000; 4: 233-238.
- Ortega MI, Valencia ME. Measuring the intake of foods and nutrients of marginal populations. Public Health Nutrition. 2002; 5 (6A): 907-910.
- Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Chadud P, Lopez I, and Amar M. Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. Am J Clin Nutr 1986;43:917-922.
- Sandström B, Cederblad A, and Lonnerdal B. Zinc absorption from human milk, cow's, and infant formulas. Am J Ois Child 1983; 137 (8): 726-729.
- Sandström B, Keen CL, and Lonnerdal B. An experimental model for studies of zinc bioavailability from milk and infant formulas using extrinsic labeling. Am J Clin Nutr 1983 ;38 (3): 420.
- Abrams SA, Wen J, and Stuff JE. Absorption of calcium, zinc, and iron from breast milk by five- to seven-month-old infants. Pediatric Research 1997;41: 384-90.
- Monsen ER. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. J Am Diet Assoc 1988; 88:786-790.
- Reddy MB, Hurrell RF, and Cook JD. Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. Am J Clin Nutr 2000; 71: 937 - 943.
- Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Kristensen L, Jensen M, Sorensen S, and Sandstrom B. Increasing the cooking temperature of meat does not affect non heme iron absorption from a phytate-rich meal in women. J Nutr 2003; 133:94-97
- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, and Cook JD. Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. Am J Clin Nutr 1988; 47: 102 -107.
- Flanagan PR, Haist J, MacKenzie, and Valberg L. Intestinal absorption of zinc: competitive interactions with iron, cobalt, and copper in mice with sex linked anemia (sla). Can J Physiol Pharmacol 1984; 62 (9): 1124-8.
- Rossander-Hulten L, Brune M, Lonnerdal B, and Hallberg L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. Am J Clin Nutr 1991 ;54 (1): 152-6.
- Dijkhuizen MA, Wieringa FT, West CE, Martuti S, and Muhilal. Effects of iron and zinc supplementation in Indonesian infants on micronutrient status and growth. J Nutr 2001; 131 (11): 2860-2865.

31. Sandström B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr* 2001; 85 (2): S181-S185.
32. Goddard WP, Coupland K, Smith JA, and Long RG. Iron uptake by isolated human enterocyte suspensions in vitro is dependent on body iron stores and inhibited by other metal cations. *Am J Clin Nutr* 1997; 127 (1): 177-183.
33. Solomons NW. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. *J Nutr* 1986;116 (6):927-935.
34. Allen LH, Gillespie SR. ACC/SCN. What works? A review of the efficacy and effectiveness of nutrition interventions. ACC/SCN: Geneva in collaboration with the Asian Development Bank, Manila, 2001. Nutrition Policy Paper No. 19: 33-34.
35. Allen LH, Bacstrand JR, Stanek EJ, Pelto GH, Chavez A, Molina E. The interactive effects of dietary quality on the growth and attained size of young Mexican children. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:353-364.

Recibido: 27-04-2004

Aceptado: 30-05-2005

## Variación de lípidos y ácidos grasos en camarones marinos consumidos en Venezuela

Tomás Cabrera, Gustavo Cabrera, Jesús Rosas, Aide Velásquez, Marisol Silva

Universidad de Oriente, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

**RESUMEN.** En el mercado interno venezolano se consumen, fundamentalmente, tres especies de camarones marinos, dos autóctonas, encontradas en su ambiente natural, *Farfantapenaeus brasiliensis* y *Litopenaeus schmitti*, y una introducida y cultivada, *L. vannamei*. El objetivo del presente trabajo fue el de determinar, si existe variación en la proporción de lípidos y el perfil de ácidos grasos de estas especies, incluso bajo diferentes condiciones de cultivo (balanceados utilizados). El total de lípidos detectado en todas las especies y condiciones de cultivo es mayor que el indicado en la bibliografía existente, superándolos en 5 a 10 veces, con valores que oscilan entre 4,8 y 10,9%, por lo que su incidencia en la salud debería ser revisada. Se evidenció una diferencia en el porcentaje de lípidos, así como en el perfil de ácidos grasos de las especies. El mayor porcentaje de lípidos fue detectado en *L. schmitti* salvaje (10,9%) seguido de *F. brasiliensis* salvaje (9,0%), *L. schmitti* cultivado (4,8% a 7,1%) y *L. vannamei* cultivado (5,1% a 6,2%). De los camarones estudiados, *L. schmitti* cultivado con el balanceado comercial aparece con mayor proporción de EPA y/o DHA, seguido de *L. vannamei* alimentados con el balanceado experimental, *L. schmitti* salvaje y alimentado con el mismo balanceado y *F. brasiliensis* salvaje.

**Palabras clave:** Lípidos, ácidos grasos, camarones marinos, *Farfantapenaeus brasiliensis*, *Litopenaeus schmitti*, *L. vannamei*, Venezuela.

**SUMMARY.** Variation of the lipids and fatty acids in marine shrimps consumed in Venezuela. There are three marine shrimp species in the Venezuelan internal market, two of them are native species, from fisheries, *Farfantapenaeus brasiliensis* and *Litopenaeus schmitti*, and one is an exotic species and farmed, *L. vannamei*. The objectives of this paper were to determine the possible variation of lipid content and fatty acid composition of these species, even under different culture conditions (e.g. feed used). The lipid content in all the species are higher (5 to 10 times) that the data from previous papers deal with marine shrimps, ranged from 4.8 to 10.9%, suggesting that its impact in the human health should be reviewed. At the same time, there were detected differences between the lipid content and fatty acids composition of the species. Wild *L. schmitti* had the highest lipid content (10.9%), following by wild *F. brasiliensis* (9.0%), cultured *L. schmitti* (4.8% to 7.1%) and cultured *L. vannamei* (5.1% to 6.2%). On the other hand, *L. schmitti* fed on commercial feed had the highest proportion of EPA and/or DHA, following by *L. vannamei* fed on the experimental feed, wild *L. schmitti* and fed with the experimental feed and wild *F. brasiliensis*.

**Key words:** Lipids, fatty acids, marine shrimps, *Farfantapenaeus brasiliensis*, *Litopenaeus schmitti*, *L. vannamei*, Venezuela.

### INTRODUCCION

En Venezuela la pesca de camarones marinos constituye una importante actividad, supliendo, en conjunto con una creciente industria del cultivo de los mismos, el mercado nacional, así como constituyéndose en un importante sector de exportación.

Las dos principales especies de camarones capturados por la flota venezolana son *Farfantapenaeus brasiliensis* y *Litopenaeus schmitti* (1). Por su parte, el cultivo de camarones marinos comenzó en Venezuela a finales de la década de los 80 (2), con la introducción de especies no nativas tales como *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*, y la criolla *L. schmitti*, con las cuales se hicieron cultivos experimentales, permitiéndose la utilización con fines comerciales de las dos especies no nativas, por las agencias gubernamentales de ambiente y pesca y acuicultura, en el año de 1992. *L. vannamei*

es la especie mas utilizada (95%), mientras que *L. stylirostris* es cultivada en una sola granja (RICOA). A pesar de ser la actividad de acuicultura mas recientemente desarrollada en Venezuela, el cultivo de camarones se ha convertido en la de mayor significado y crecimiento desde su inicio. Se considera una producción en el 2000 cercana a las 10.000 TM (1), estimándose que en la actualidad supere las 25.000 TM.

La composición lípidica de los organismos marinos, incluyendo los camarones, ha sido extensamente estudiada, en parte para determinar los requerimientos nutricionales de las especies sometidas a cultivo (1), y por otro lado por su importancia en la nutrición humana, por poseer una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente de la cadena n-3, los cuales han sido relacionados con la prevención de enfermedades cardiovasculares (3). De acuerdo a estudios realizados, el porcentaje de lípidos así como el perfil de ácidos grasos de los camarones varía de acuerdo a la dieta

suministrada (4) o al alimento natural disponible (5), al igual que las condiciones sanitarias de los mismos (6).

El objetivo de este trabajo fue el de determinar las variaciones en la composición lípidica y el perfil de ácidos grasos de los camarones capturados y/o cultivados en Venezuela, bajo condiciones de sistema semiintensivo y siguiendo los programas de alimentación estandarizados (1).

## MATERIALES Y METODOS

### Camaroneros

El estudio comprendió el análisis de lípidos y ácidos grasos de tres especies de camarones. La especie introducida, co-

mercialmente cultivada en Venezuela, *Litopenaeus vannamei*, se obtuvo de una empresa comercial (Aquatec), en la cual se emplea el alimento comercial (K), así como cultivados en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Científicas (IIC) de la Universidad de Oriente, en la cual se alimentan con dos balanceados diferentes (K y E). Así como de dos de las especies autóctonas, *L. schmitti*, cultivada en el IIC y alimentados con dos balanceados diferentes (K y E), e individuos capturados en las inmediaciones de la isla de Coche, y *Farfantapenaeus brasiliensis* colectados en el medio natural, específicamente en la Laguna La Restinga, Isla de Margarita. Las condiciones de cultivo y hábitat de cada grupo se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1  
Características físico-químicas del agua de hábitat de los camarones y tipo de alimento utilizado

Especies	Habitat	Temp. (°C)	Salinidad (ppm)	Oxígeno disuelto (mg/ml)	Tipo de alimento
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquatec	25 - 33	35 - 40	6,00 - 8,00	K
<i>L. vannamei</i>	IIC	30 - 32	38 - 41	3,43 - 4,24	K
<i>L. vannamei</i>	IIC	30 - 32	38 - 41	3,43 - 4,24	E
<i>L. schmitti</i>	Isla de Coche	26 - 29	35 - 37	5,60 - 7,40	natural
<i>L. schmitti</i>	IIC	30 - 32	38 - 41	3,43 - 4,24	K
<i>L. schmitti</i>	IIC	30 - 32	38 - 41	3,43 - 4,24	E
<i>Farfantapenaeus brasiliensis</i>	La Restinga	26 - 29	38 - 39	5,70 - 8,20	natural

Aquatec = Granja comercial de camarón

IIC = Instituto de Investigaciones Científicas

ppm = partes por mil

K = Balanceado comercial

E = Balanceado experimental

### Balanceados

En el cultivo de camarones, en las instalaciones del IIC, se emplearon dos tipos de balanceados, uno comercial (K) y uno experimental (E), ambos provenientes de una misma fábrica comercial de balanceados para camarones, ubicada en Venezuela. En la Tabla 2 se presentan las características principales de cada uno. Es de resaltar que por ser balanceados comerciales su composición detallada no está disponible al público, aunque se conoce que los principales componentes son harinas de pescado y soya, además de maíz, trigo, mezclas de vitaminas y minerales, etc. (1).

### Preparación de las muestras

Los camarones de las diferentes especies y tratamientos fueron capturados de los sistemas de mantenimiento, lavados con agua de mar filtrada y colocados, enteros, en un liofilizador hasta su secado total.

TABLA 2

Composición proximal de los balanceados aplicados a los camarones *L. vannamei* y *L. schmitti* en los estanques de cultivo del IIC. Datos indicados en la etiqueta de los productos

Ingredientes (%)	Balanceado K	Balanceado E
Proteína cruda	35	32
Grasa cruda	6	7
Fibra cruda	4	3
Humedad	12	10

IIC = Instituto de Investigaciones Científicas

K = Balanceado comercial

E = Balanceado experimental

### Extracción de lípidos (7,8)

Se pesó 1 gr de la muestra seca triturada y se le agregó 25 ml de 2- propanol. Se llevó a un ultrasonido durante 10 minutos, se le agregó 30 ml de una mezcla de cloroformo (4): metanol(2): agua(1), se agitó y centrifugó a 840 x g por 10 minutos para separar el residuo insoluble en la mezcla. Éste procedimiento se realizó 5 veces para asegurar la extracción total. Los lípidos y los mono y oligosacáridos quedaron solubilizados en la mezcla. Posteriormente se adicionó 200 ml de una mezcla cloroformo:agua 1:1 para separar los lípidos, en la capa orgánica, de los mono y oligosacáridos en la capa acuosa. El solvente fue evaporado y pesado y calculado el porcentaje de lípidos totales.

### Metilación de ácidos grasos (8)

Se colocaron de 16 a 20 mg de cada muestra de lípidos totales en viales con tapa. Se les agregó  $\text{BF}_3$  en metanol, los viales fueron sellados con teflón y colocados en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se le añadió una mezcla de hexano (2): metanol (1), se calentaron a ebullición nuevamente por 10 minutos. Después de enfriarse la mezcla de reacción se extrajo con hexano (2): agua (1).

### Determinación e identificación del contenido de ácidos grasos mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa Saturno GC/MS 2000

La identificación fue realizada por comparación de los espectros de masas obtenidos con sus respectivos patrones de fragmentación contra los espectros de masas almacenados como referencia en la biblioteca del equipo, tomando como más probable aquel cuyo índice de confianza fuera el mayor. La cuantificación fue dada por el integrador del equipo. Solo se tabularon los 10 ácidos grasos mas abundantes, realizándose un ajuste al 100% de estos valores.

## RESULTADOS

El porcentaje de lípidos totales en los dos balanceados analizados fue de  $8,1 \pm 0,1\%$  para el comercial (K) y  $6,4 \pm 0,1\%$  para el experimental (E). El perfil de ácidos grasos de cada balanceado presentó diferencias importantes (Tabla 3). En el balanceado comercial se detectó un elevado porcentaje del 18:3n-3 el cual no se evidenció en el experimental, seguido por el 18:2n-6, el 16:0 y el 18:0, mientras que los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 20:5n-3 se detectaron en mayor porcentaje en el balanceado experimental.

TABLA 3

Porcentaje de ácidos grasos en dos balanceados comerciales (K y E) para camarones

Acido Graso	Balanceado K	Balanceado E
14:0	1,783	8,596
15:0	0,001	0,712
16:0	13,600	36,150
17:0	0,001	0,001
18:0	8,290	14,050
16:1n-7	3,243	5,255
18:2n-6	30,210	32,240
18:3n-3	35,980	0,001
20:5n-3	0,001	2,364
22:6n-3	2,850	1,325

El porcentaje de lípidos totales en las muestras de *Farfantapenaeus brasiliensis* salvaje fue de 9,0% (Tabla 4). En relación a *Litopenaeus schmitti*, se detectó que los camarones salvajes presentaron el mayor porcentaje de lípidos (10,9%) seguido por los cultivados utilizando el balanceado E (7,1%) y con el balanceado K (4,8%) (Tabla 4). El porcentaje de lípidos totales en las muestras de *L. vannamei* osciló entre 5,1 y 6,2% (Tabla 4), no detectándose variación entre los camarones alimentados por los dos balanceados utilizados. Sin embargo, se evidenció una variación significativa al comparar la cantidad de lípidos totales de los camarones cultivados en la granja piloto y aquellos provenientes de una instalación comercial (5,9-6,2 vs 5,1%) (Tabla 4).

TABLA 4

Peso y porcentaje de lípidos totales presentes en camarones alimentados con dos balanceados y salvajes

Especie	Peso $\pm$ 0,001g	Lípidos totales (%)
<i>Farfantapenaeus brasiliensis</i> (salvaje)	0,451	9,0 $\pm$ 0,1
<i>L. schmitti</i> (salvaje)	0,546	10,9 $\pm$ 0,1
<i>L. schmitti</i> (K)	0,238	4,8 0,1
<i>L. schmitti</i> (E)	0,354	7,1 0,1
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Aquatec)	0,253	5,1 $\pm$ 0,1
<i>L. vannamei</i> (K)	0,298	5,9 0,1
<i>L. vannamei</i> (E)	0,309	6,2 0,1

En relación a *L. schmitti*, el porcentaje de lípidos fue significativamente menor cuando esta especie fue sometida a condiciones de cultivo, evidenciándose, igualmente, una diferencia entre los dos balanceados utilizados.

En relación a los ácidos grasos, el ácido palmítico (16:0) fue el más común en todas las especies analizadas, coincidiendo con trabajos previos (5,12,14), seguido del ácido linolénico (18:3n-3) en *L. vannamei* y del ácido linoléico (18:2n-6) en *L. schmitti* y *F. brasiliensis* (Tabla 5). Sin embargo, el ácido docosaexanóico (22:6n-3) y el eicosaepantenóico (20:5n-3), señalados como importantes en

todos los trabajos indicados, solo fueron detectados en *L. vannamei* alimentado con el balanceado experimental y *L. schmitti* alimentado con el balanceado comercial. Por su parte, el ácido eicosaepantenóico fué detectado en *L. schmitti* salvaje y alimentado con el balanceado experimental. Mientras que en *F. brasiliensis* solo se detectó el ácido docosaexanóico.

TABLA 5

Porcentaje de ácidos grasos presentes en camarones cultivados y alimentados con dos balanceados comerciales (K y E) y camarones salvajes (S)

Acido graso	<i>Litopenaeus Vannamei</i>	<i>L. vannamei</i> (K)	<i>L. vannamei</i> (E)	<i>Litopenaeus Schmitti</i> (S)	<i>L. schmitti</i> (K)	<i>L. schmitti</i> (E)	<i>Farfantapenaeus brasiliensis</i> (S)
14:0	3,195	2,882	2,353	2,135	0,991	1,296	4,466
15:0	0,920	2,398	1,376	2,124	0,774	1,844	0,837
16:0	67,261	46,929	35,210	21,530	28,370	22,526	47,550
17:0	1,532	2,972	2,546	3,725	1,094	4,635	0,001
18:0	1,919	0,001	24,180	13,570	21,850	15,153	6,685
16:1n7	0,001	0,001	1,668	11,59	0,535	3,077	0,001
18:2n6	3,311	5,665	4,307	24,280	23,610	18,922	26,020
18:3n3	21,140	30,975	22,250	0,001	0,001	25,75	0,001
20:5n3	0,001	0,001	2,357	4,360	2,109	3,608	0,001
22:6n3	0,001	0,001	2,056	0,001	18,810	0,001	2,878

(K) = Balanceado comercial

(E) = Balanceado experimental

(S) = Salvajes

En *F. brasiliensis*, el ácido graso determinado en mayor porcentaje fue el 16:0 seguido del 18:2n-6, el 18:0 y el 14:0 (Tabla 5). En *L. schmitti*, indistintamente de las condiciones de habitat y balanceado utilizado, los ácidos graso determinados en mayor porcentaje fueron el 16:0, el 18:0 y el 18:2n-6, observándose diferencias en relación al más importante de estos tres en las condiciones citadas (Tabla 5). Por otra parte, el perfil de ácidos grasos de los camarones cultivados con los dos balanceados mostraron diferencias en relación al ácidos grasos 22:6n-3, el cual se detectó en mayor porcentaje en los camarones alimentados con el balanceado K, y 15:0, 17:0, 16:1n-7 y 18:3n-3 detectados en mayor porcentaje en aquellos alimentados con el balanceado E (Tabla 5).

Las dos especies colectadas en su estado natural, *L. schmitti* y *F. brasiliensis*, presentaron un perfil con ciertas variaciones importantes. Mientras que en *L. schmitti* se detectó 20:5n-3 y no 22:6n-3, en *F. brasiliensis* fue a la inversa. Además, en *F. brasiliensis* se observó una menor distribución en los porcentajes de los ácidos grasos analizados, en comparación con *L. schmitti*.

En *F. brasiliensis*, los valores detectados en esta investigación, en relación a los ácidos grasos 16:0 y 18:2n-6 fueron superiores a los reportados para en la misma área de

estudio, mientras que los de 18:0 fueron similares (6).

El perfil de ácidos grasos de *L. schmitti* salvaje y el cultivado con cada balanceado fue similar, con la excepción del 16:1n-7, cuyo porcentaje fue superior en el salvaje; el 18:3n-3, el cual no se detectó en el salvaje ni en el cultivado con el balanceado comercial (K), mientras que en el cultivado con el balanceado experimental (E), fue el tercero en importancia, con un valor alto; y el 22:6n-3, el cual se detectó en los camarones cultivados con el balanceado comercial (K), en un valor significativo y muy superior a las otras dos muestras. Por otra parte, se evidenciaron diferencias importantes entre el perfil de ácidos grasos de los balanceados utilizados y el de los camarones alimentados con cada uno. Al respecto observamos que mientras el 18:3n-3 constituía el principal ácido graso en el balanceado comercial, el mismo se encontraba en muy bajo porcentaje en los camarones, observándose, además, un incremento del 22:6n-3, el 16:0 y el 18:0. Igualmente, al considerar los camarones alimentados con el alimento experimental, se evidenció un incremento sustancial del 18:3n-3 y disminuciones del 16:0 y el 18:2n-6 en los camarones.

En *L. vannamei*, indistintamente de las condiciones de granja y balanceado utilizado, el ácido graso determinado en mayor porcentaje fue el 16:0 seguido del 18:3n-3. Por otra

parte, el perfil de ácidos grasos de los camarones cultivados con los dos balanceados mostraron diferencias en relación a los ácidos grasos 15:0, 16:0 y 18:3n-3 los cuales se detectaron en mayor porcentaje en los camarones alimentados con el balanceado K, y los ácidos grasos 18:0, 16:1n-7, 20:5n-3 y 22:6n-3 detectados en mayor porcentaje en aquellos alimentados con el balanceado E (Tabla 5). Los camarones de la granja comercial y los alimentados con la dieta K presentaron un perfil de ácidos grasos similares (Tabla 5). Es de destacar que la granja comercial de la cual se obtuvieron las muestras utiliza el alimento comercial (K), por lo cual, como era de esperarse, el perfil de ácidos grasos es similar al cultivado experimentalmente en la estación de la UDO.

Por otra parte se evidenció una diferencia entre los camarones cultivados con cada alimento balanceado, detectándose una mayor diversidad de ácidos grasos en aquellos alimentados con el balanceado experimental (E), además de haberse detectado 20:5n-3 y 22:6n-3. Por otra parte, se evidenciaron diferencias importantes entre el perfil de ácidos grasos de los balanceados utilizados y el de los camarones alimentados con cada uno. Al respecto observamos que mientras el 18:2n-6 constituyó uno de los principales ácidos grasos en el balanceado comercial, el mismo disminuyó, significativamente, en los camarones, observándose, además, una disminución del 22:6n-3 y un incremento del 16:0. Igualmente, al considerar los camarones alimentados con el balanceado experimental, se evidenció un incremento sustancial del 18:3n-3 y disminuciones del 18:2n-6 en los camarones.

Al comparar las dos especies (*L. schmitti* y *L. vannamei*) cultivadas con el mismo balanceado (K y E), observamos perfiles de ácidos grasos diferentes. En general, el 18:2n-6 constituyó un importante porcentaje en *L. schmitti*, mientras que en *L. vannamei* encuentra en porcentaje intermedio. Cuando las dos especies fueron alimentadas con el balanceado comercial (K), *L. vannamei* presentó el 18:3n-3 como uno de los ácidos grasos principales, careciendo del 22:5n-3 y del 18:0, mientras que en *L. schmitti* se detectó lo contrario. Con el alimento experimental (E), los perfiles de ácidos grasos de ambas especies fueron menos diferentes, destacándose la carencia del 22:6n-3 en *L. schmitti*.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En Venezuela, la industria del cultivo de camarones marinos utiliza cinco tipos de alimento comerciales (2), todos ellos formulados para el cultivo de *L. vannamei*. En general, estos alimentos poseen una composición similar, con porcentajes de proteínas entre 24% y 36% y de lípidos entre 4% y 7%. El porcentaje de fibra es 3% - 4%, mientras que los porcentajes de calcio y fósforo oscilan alrededor de 2,5% y 1,5% respectivamente. En este estudio, tanto el alimento comercial

como el experimental, elaborado por una planta de fabricación de alimento, están dentro de los rangos característicos de los balanceados para camarones en la industria venezolana. Las especificaciones del balanceado experimental indican un porcentaje de proteínas, grasa, fibra y humedad menor que el comercial utilizado. En los análisis del laboratorio se confirmó los valores de lípidos.

La detección de elevados porcentajes de 18:2n-6 en ambos balanceados indicó que el componente vegetal fue importante en la elaboración de los mismos.

Estos valores están muy por encima de aquellos detallados en la bibliografía, encontrándose una concentración de 1,2 g/100 g en *Penaeus aztecus* (9); 1,3g/100g en *Pandalus borealis* y *Pandalus jordani* (10); 0,8 a 1,1g/100g en seis especies diferentes (*P. durarum notialis*, *P. vannanei*, *P. aztecus aztecus*, *P. durarum durarum*, *P. aztecus subtilis* y *P. boreallis*)(11); concentraciones entre 1,1 y 4,2 g/100 g en 18 especies de camarones, entre las cuales, *F. brasiliensis* presentó una concentración de 4,2 g/100g (12). concentraciones entre 0,9 y 1,1g/100g para *F. brasiliensis* (13), y de 1,13 para una mezcla de *F. brasiliensis* y *P. paulensis* (14). Los valores detectados en esta investigación coinciden, parcialmente, con los determinados para *F. brasiliensis* salvajes, el cual señala valores de lípidos de 20; 5,83 y 9,41% para el cefalotórax, abdomen y exoesqueleto, respectivamente, y valores ligeramente inferiores en aquellos sometidos a cultivo (6).

Es de hacer destacar que los trabajos reseñados anteriormente, los camarones fueron tratados previamente con químicos para su preservación para el mercado, o bien pelados y removido la cabeza y el tracto digestivo. En esta investigación se trabajó con camarones frescos congelados inmediatamente de su captura o cosecha, sin adicionarle ningún preservativo. Además, considerando el mercado local, en el cual el camarón es consumido entero con cabeza y sin pelar previamente, los análisis se realizaron en estas condiciones.

En su estado salvaje, los camarones se alimentan de una gran variedad de organismos, que incluyen micro y macroalgas, poliquetos, crustáceos y bivalvos, así como también detritus. A pesar de la variabilidad geográfica en la cual se encuentran las diferentes especies de camarones, se ha comprobado que sus fuentes de alimento tienen similar porcentaje de lípidos, así como perfil de ácidos grasos (5). Por tal motivo, podemos establecer que la razón principal por la que se evidencia variación entre los valores detectados en esta investigación y los trabajos señalados anteriormente se deben, fundamentalmente, a las condiciones de las muestras utilizadas. Sin embargo, los valores encontrados en los camarones cultivados son igualmente superiores a los indicados en las referencias anteriormente señaladas.

El porcentaje de lípidos en los camarones cultivados con el balanceado experimental fueron superiores a aquellos

alimentados con el balanceado comercial, evidenciándose una relación inversa con el porcentaje de grasas en el tipo de balanceado utilizado. Este aspecto, puede estar relacionado con el hecho de que el balanceado comercial, así como el experimental, fueron elaborados en base a los requerimientos nutricionales de esta última especie, por lo que pudo influenciar en la composición química de *L. schmitti* al verse obligada esta especie a utilizar diferentemente los nutrientes suministrados. Por otra parte, no se ha encontrado una relación directa entre el porcentaje de grasas en el balanceado utilizado y *L. vannamei* (4). El hecho de que estos balanceados estén diseñados para cubrir las necesidades nutricionales de *L. vannamei*, no necesariamente significa que pueden satisfacer las necesidades de otras especies, incluyendo *L. schmitti*. De hecho, las otras especies de camarones cultivadas mundialmente, entre las cuales destacan *P. monodon*, *P. japonicus* y *P. chinensis* (15), son alimentadas con balanceados con diferente composición, incluyendo variación en el porcentaje de lípidos (15). Esta condición explicaría, en parte, el porque del menor valor de lípidos en los ejemplares de *L. schmitti* cultivados, sugiriéndose que debe utilizarse un balanceado con mayor porcentaje de lípidos para su cultivo.

El camarón blanco de Pacífico, *L. vannamei*, es la principal especie cultivada comercialmente en Venezuela. Solo un pequeño porcentaje de la producción es consumida localmente, siendo un producto, fundamentalmente de exportación.

En relación al porcentaje de lípidos en *L. vannamei*, estos son superiores a los señalados por otros autores (11), posiblemente por las mismas condiciones descritas anteriormente en relación a las especies salvajes. Sin embargo, se encuentran dentro del rango establecido para esta especie por una serie de autores, entre 3,90% y 6,87% (16,4).

En las especies cultivadas, se detectó los mayores valores de lípidos cuando fueron alimentadas con el balanceado experimental, el cual poseía el menor porcentaje de los mismos.

Las variaciones, en relación al tipo de balanceado utilizado, así como a las condiciones de cultivo, detectadas en esta experiencia, han sido reportadas utilizando diferentes tipos de dietas (16), diferentes porcentajes de lípidos en las dietas (4) y diferentes condiciones de cultivo (17). En este sentido, se ha reportado que el porcentaje de lípidos en *L. vannamei* alimentado con dietas con diferentes proporciones de harina de soya, se mantuvo similar, variando alrededor de 5,18% a 5,88% (16). Por otra parte, en *L. vannamei* alimentados con dietas de 7,29% a 7,38% de lípidos, los valores en la carne oscilaron entre 3,90% y 6,87%, observándose una relación directa (4). Por otra parte, en *Penaeus stylirostris* cultivados en menores densidades y de mayor talla tenían un mayor porcentaje de lípidos (17). Igualmente, se ha demostrado que la composición de los lípidos neutros y polares de los camarones

eran similares a los de las dietas (18).

Se considera que el tejido de los peneidos muestran una composición de ácidos grasos similar a la que consumen (19). Las dos especies autóctonas tienen una distribución diferente. Mientras que *L. schmitti* está adaptada para ambientes más salobres (20), *F. brasiliensis* se localiza en ambientes estrictamente salinos (21). Es de suponer que existe variación en la composición de los ítems alimenticios consumidos, tanto cualitativamente como químicamente, en los dos ambientes en los cuales se desenvuelven estas dos especies. Por otra parte, ambas especies presentaron un gran porcentaje de 18:2n-6. Los ácidos grasos de cadena n-6 son asociados con aceites vegetales (11), por lo que se sugiere que estas especies consumen una elevada cantidad de material vegetal en su ambiente natural.

En *L. stylirostris* el perfil de ácidos grasos varía de acuerdo a la calidad del agua en el cual son cultivados (17). En este sentido se puede inferir que la calidad del agua en ambas instalaciones de cultivo (UDO y Aquatec) estaba dentro del mismo rango de aceptación para la especie.

Los ácidos grasos n-3 se encuentran, principalmente, en los productos marinos (11). Aunque se considera que el perfil de ácidos grasos de los camarones es similar a la dieta utilizada (22), se ha indicado que los camarones metabolizan los ácidos grasos de diferentes maneras. Los camarones tienen una limitada capacidad de desaturar y elongar el ácido linoleico a ácido eicosapentenoico y docosahexaenoico (23). En juveniles de *P. monodon* se demostró que son capaces de elongar y desaturar 20:5n-3 a 22:6n-3, al igual que realizar la retroconversión (24). Los camarones posiblemente desaturan 16:0, pero no se ha detectado la elongación y desaturación de ácidos grasos con 18 carbonos (18). En *P. monodon*, no detectaron de novo síntesis de 18:3n-3 ni la bioconversión del 18:3n-3 a ácidos grasos monoinsaturados de mayor cadena, pero si evidenciaron la elongación y desaturación de 20:5n-3 a 22:6n-3 y la retroconversión de 22:6n-3 a 20:5n-3 (24, 25). En *P. chinensis*, no se detectó desaturación de 18:2n-6 ni de 18:3n-3, pero si una elongación de estos ácidos a 20:2n-6 y 20:3n-3 (26).

La diferencia entre los valores detectados en esta investigación, con los señalados por otros autores, puede deberse a la metodología empleada, con respecto a la parte del organismo utilizada para el análisis. Se ha determinado que la distribución de los lípidos, y por ende de los ácidos grasos en el camarón varía. En este sentido, se ha reportado mayor proporción de lípidos en el hepatopancreas que en el músculo al alimentar los camarones con dietas suplementadas con fosfolípidos (27). Al realizar el análisis considerando todo el cuerpo del organismo, es de esperarse que las proporciones sean menores o mayores si solo se analizan partes del mismo, debido a que se considera al peso total del organismo. Igualmente, en las gónadas de *Penaeus semisulcatus*, se ha indica-

do un decrecimiento, a medida de que estas maduraban, de los ácidos grasos poliinsaturados, confirmando la síntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (28).

El análisis del porcentaje de lípidos y ácidos grasos de los camarones consumidos por el mercado venezolano, indican que existe una variación entre las especies en ambos aspectos. El total de lípidos es mayor que el indicado en la bibliografía, superándolos en 5 a 10 veces, por lo que su incidencia en la salud debería ser revisada. De los camarones estudiados, *L. schmitti* aparece con mayor proporción de EPA y/o DHA, seguido de *L. vannamei* alimentados con el balanceado experimental, *L. schmitti* salvaje y alimentado con el mismo balanceado y *F. brasiliensis* salvaje.

### REFERENCIAS

- Cabrera T. El cultivo semi-intensivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*: caso AQUATEC (trabajo de Ascenso para Profesor Titular). Nueva Esparta, Venezuela: Universidad de Oriente; 2001.
- Carrasco D, Duarte J, Blanco V, Castillo E, Patti J, Rosas J, Silva M, Cabrera T, Jory D. The Venezuelan shrimp farming industry: status and perspectives. En Jory D. editor. Responsible Aquaculture for a Secure Future: Proceedings of a Special Session on Shrimp Farming. The World Aquaculture Society, Louisiana. United States. 2003. P. 35-41.
- 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.
- Lim C. Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. J World Aqua Soc 1996; 27(4):402-9.
- Araujo, MA, Lawrence, AL. Fatty acid profiles of muscle and midgut gland from wild *Penaeus californiensis*, *P. occidentalis*, *P. setiferus*, *P. stylirostris*, and *P. vannamei*. J. World Aquac Soc 1993; 24(3):425-8.
- Carrasquel C. Efecto de la composición de ácidos grasos en dietas semipurificadas sobre el crecimiento de *Penaeus brasiliensis* Latreille (Crustáceo, Decapoda, Penaeidae). (tesis). Caracas: UCV ; 1984.
- Volkman JK, Jeffrey S, Niehols P, Rogers G, Garland C. Assesment of biochemical composition and energy reserves in larvae of scallop *Patinopecten yessoensis*. J Exp Bio Ecol 1987;113:113-124.
- Morrison W, Smith L. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride- metanol. J Lip Res 1964); 5:600-608
- Johnston JJ, Ghanbari HA, Wheeler WB, Kirk JR. Characterization of shrimp lipids. J Food Sci. 1983; 48:33-5.
- King I, Childs M, Dorset C, Ostrander JG, Monsen ER. Shellfish: proximate composition, minerals, fatty acids and sterols. J Am Diet Assoc. 1990; 90(5):677-85.
- Krzynowek J, Panunzio LJ. Cholesterol and fatty acids in several species of shrimp. J Food Sci 1989; 54(2):237-9.
- Takada K, Takako A, Kunisaki N. Proximate composition, free amino acid, fatty acid, mineral and cholesterol contents in imported frozen shrimps. Nippon Suisan Gakkaishi 1988; 54(12):2173-9.
- Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Total Lipid, Cholesterol, and Fatty Acids of Farmed Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schmitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). J Food Comp Anal 2001; 14(4):359-69.
- de Moura AF, Torres RP, Mancini-Filho J, Tenuta Filho A. 2002. Characterization of the lipid portion of pink shrimp commercial samples. Arch Latinoamer Nutr 2002; 52(2):207-11.
- Shi-Yen Shiau. Nutrient requirements of penaeid shrimps. Aquaculture 1998; 164(1-4):77-93.
- Lim C, Dominy W. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 1990; 87:53-63.
- Landau M. Nutritional chemistry of large and small shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson) reared in an aquaculture/waste water system. Comp Biochem Phys 1985; A 80(2):205-7.
- Deering M, Fielder D, Hewitt D. Growth and fatty acid composition of juvenile leader prawns, *Penaeus monodon*, fed different lipids. Aquaculture 1997; 151(1-4):131-41.
- Clarke A, Wickins J. Lipid content and composition of cultured *Penaeus merguensis* fed with animal food. Aquaculture 1980; 29:17-27.
- Morales P. Sobre camarón y cría. Mar Pesca 1971; 68:22-7.
- Robaina G. Efectos de la salinidad y la temperatura en la sobrevivencia del camarón *Penaeus brasiliensis* Latreille (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Rev Lat Acui 1983; 17:1-54
- Lim C, Ako H, Brown C, Hahn K. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. Aquaculture 1997; 151(1-4):143-53.
- Lim C, Akiyama D. Nutrient requirements of penaeid shrimp. En: Sessa DJ, Lim C, editors. Nutrition and Utilization of Technology in aquaculture. New York: AOCS Press. 1995. P. 60-73.
- Merican ZO, SMI KF. Qualitative requirements of essential fatty acids for juvenile *Penaeus monodon* Aquaculture 1996; 147(3-4):275-91
- Merican ZO, SMI KF. Quantitative requirements of linolenic and docosahexaenoic acid for juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture 1997; 157(3-4):275-93
- Xu X, Ji W, Castell J, O'Dor R. Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. Aquaculture 1994; 127(1):29-40.
- Gong AH, Lawrence AL, Jianga DH, Castille FL, Gatlin III DM. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*. I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. Aquaculture 2000; 190(3-4):305-24.
- Ravid T, Tietz A, Khayat M, Boehm E, Michelis R, Lubzens E. Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). J Exp Biol 1999; 202 (Pt 13):1819-29.

Recibido: 18-01-2005

Aceptado: 01-08-2005

## NUEVOS LIBROS

**Recomendaciones de Ingestión de Nutrientes para la Población Mexicana. Bases Fisiológicas.** Héctor Bourges, Esther Casanueva y Jorge L. Rosado. 2005. Editorial Médica Panamericana, SA de CV. México. 430 páginas.

Esta publicación es el resultado del trabajo de cerca de 48 expertos investigadores mexicanos en el área de nutrición. Para la elaboración de las recomendaciones, el comité consideró información internacional actualizada e investigaciones específicas para la población mexicana. En los primeros dos capítulos se revisan los conceptos básicos de requerimiento nutrimental promedio (RPN), la ingestión diaria recomendada (IDR), la ingestión diaria sugerida (IDS) y el límite superior de consumo (LSC) y los requerimientos nutrimentales y sus características principales de una manera muy clara. Los siguientes capítulos incluye los factores genéticos y nutrición y las bases fisiológicas y los valores nutrimentales de referencia para Vitamina A y Carotenos, Vitamina D, E, K, C, Tiamina, Riboflavina, Niacina,

Piridoxina, Acido Pantoténico, Biotina, Vitamina B<sub>12</sub>, Folato, Agua, Sodio, Cloro y Potasio, Calcio y Fosfato, Magnesio, Hierro, Zinc, Cobre, Cromo, Manganeso, Yodo, Flúor, Selenio, Taurina, Isoflavonas y finalmente Nucleótidos, Carnitina, Colina, Inositol y Oligosacáridos. Cada capítulo describe los aspectos históricos, biodisponibilidad, las funciones metabólicas, la deficiencia y su cuadro clínico, las bases para establecer los valores nutrimentales de referencia y los aspectos relacionados con toxicidad para cada nutriente. Los Valores Nutrimentales de Referencia para los diferentes grupos de edad se definen para cada nutriente.

Aunque esta publicación es parte de la revisión hecha para la Población Mexicana, Recomendaciones de Ingestión de Nutrientes para la Población Mexicana Bases Fisiológicas, es un libro cuidadosamente concebido cuya lectura será de gran utilidad para todos los profesionales de la nutrición de habla hispana como referencia para un claro entendimiento de las bases fisiológicas consideradas en la elaboración de una recomendación nutrimental para una población.

Juan Pablo Peña-Rosas

# INFORMACION PARA LOS AUTORES

En 1950 el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela edita su revista Archivos Venezolanos de Nutrición la cual en 1965 es donada a la recién creada Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN, para convertirse en su órgano oficial de divulgación Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN.

ALAN acoge en sus páginas trabajos de revisión, editoriales, conferencias y simposia y trabajos científicos originales sobre temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, ciencia y tecnología de alimentos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, nutrición clínica y comunitaria, educación en nutrición y microbiología de alimentos.

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados para ser publicados y se reserva el derecho de no publicar los originales que no se ajusten a los lineamientos de la revista. No se devolverán originales ni se mantendrá correspondencia sobre aquellos que no sean publicados. ALAN se reserva los derechos de reproducción de los artículos seleccionados.

ALAN se acoge a las normas de los requisitos uniformes del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (CIDRM), también conocido como el Grupo de Vancouver, en su quinta edición (1997) de los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas (1). A continuación se reproduce esta publicación y se añaden algunas recomendaciones específicas, para ALAN.

## Requisitos para la presentación de manuscritos a una revista

### Resumen de los requisitos técnicos

- Todas las partes del manuscrito estarán a doble espacio.
- Cada sección o componente comenzará en página nueva.
- Revise la secuencia: página del título, resumen y palabras clave, texto agradecimientos, referencias, cuadros (cada uno en página aparte), pies e epígrafes de las ilustraciones.
- Las ilustraciones se presentaran en forma de impresiones fotográficas sin tomar, y no deberán exceder de 203 x 254 mm.
- Incluya la autorización para reproducir material publicado con anterioridad o para usar ilustraciones en las que se pueda identificar a los sujetos humanos.
- Adjunte la transferencia de los derechos de autor y otros formularios.
- Presente el número exigido de copias impresas del artículo (ALAN exige original y 3 copias).
- Guarde copias de todo lo que envíe.

### Preparación del manuscrito

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide generalmente, aunque no por fuerza, en secciones que llevan estos encabezamientos: introducción, métodos, resultados y discusión. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Es probable que otro tipo de artículos -como los informes de casos, las revisiones y los editoriales- exijan otra estructura. Para mayor orientación, los autores deberán consultar la revista en la que pretenden publicar.

Mecanografíese el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 280 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos 25mm (ALAN prefiere la medida de 216 x 280 mm). Escríbase o imprímase solamente sobre una cara del papel. Utilícese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

### Página del título

La primera página contendrá: 1) el título del artículo, que será conciso pero informativo; 2) nombre de pila preferido y apellidos de cada autor, acompañados de sus grados académicos más importantes y su afiliación institucional; 3) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; 4) declaraciones de descargo de responsabilidad, si las hay; 5) nombre y dirección del autor que se ocupará de la correspondencia relativa al manuscrito; 6) nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todo ello; y 8) título abreviado (titulillo) que no pase de 40 pulsaciones (contando caracteres y espacios), el cual se colocará, debidamente identificado como tal, en la última línea de la página inicial.

### Autoría

Todas las personas designadas como autores habrán de cumplir con ciertos requisitos para tener derecho a la autoría. Cada autor

---

(1) Requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas. Rev Panam Salud Pública. Pan-Am J Pub Health. 1998;3(3):188-1998.

debe haber participado en el trabajo en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido. Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores. Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

Cada vez es más común que los ensayos multicéntricos se atribuyan a un autor corporativo. Todos los miembros del grupo que sean designados como autores, ya sea en la línea destinada al nombre de los autores a continuación del título o en una nota a pie de página, deberán cumplir plenamente con los requisitos de autoría recién señalados. Los miembros del grupo que no cumplan con dichos criterios serán mencionados, con su autorización, en la sección de agradecimientos o en un apéndice (véase "Agradecimientos").

El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de estos. Como los autores se suelen enumerar de distintas maneras, el significado del orden en que aparecen no puede deducirse con exactitud a menos que ellos mismos lo enuncien explícitamente. Para tal efecto, tal vez deseen agregar, en una nota a pie de página, la explicación sobre el orden de enumeración. Al decidir acerca de dicho orden, los autores tendrán presente que muchas revistas imponen un límite al número de autores que figuran en el índice de materias y que, cuando hay más de 25 autores, la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos incluye en MEDLINE tan solo los nombres de los 24 primeros más el del último.

### Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporciónense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. Utilícense para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de temas médicos] del Index Medicus; en el caso de términos de reciente aparición que todavía no figuren en dicha lista, podrán usarse las expresiones corrientes. ALAN exige que todo trabajo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen debe presentarse en español, igualmente con sus palabras clave.

### Introducción

Expresé el propósito del artículo y resuma el fundamento lógico del estudio u observación. Menciones las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

### Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio, como son el protocolo (población de estudio, intervenciones o exposiciones, resultados y el fundamento lógico del análisis estadístico), asignación de intervenciones (métodos de aleatorización, ocultamiento de la asignación a los grupos de tratamiento) y método de enmascaramiento (método ciego).

Los autores que presenten manuscritos de revisión incluirán una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar los datos. Estos métodos se mencionarán también en forma sinóptica en el resumen.

**Ética.** Cuando informe sobre experimentos en seres humanos, señale si los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos o con la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 1983. No utilice el nombre de los pacientes, sus iniciales ni los códigos hospitalarios, especialmente en el material ilustrativo. Cuando dé a conocer experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución, las de un consejo nacional de investigación o cualquier ley nacional acerca del cuidado y el uso de animales de laboratorio.

**Estadística.** Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición (por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información cuantitativa importante.

Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado.

Las descripciones generales de los métodos utilizados deben aparecer en la sección de métodos. Cuando resuma los datos en la sección de resultados, especifique los métodos estadísticos que se emplearon para analizarlos. Limite el número de cuadros y figuras al mínimo necesario para explicar el tema central del artículo y para evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las gráficas y los cuadros. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra». Defina los términos, las abreviaturas y la mayor parte de los símbolos estadísticos.

## Resultados

En el texto, los cuadros y las ilustraciones, presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de los cuadros ni de las ilustraciones; destaque o resuma tan solo las observaciones importantes.

## Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afirmaciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales. Cuando sea apropiado, puede incluir recomendaciones.

## Agradecimientos

En un lugar adecuado del artículo (como nota al pie de la primera página o como apéndice del texto; véanse los requisitos de la revista) uno o varios enunciados especificarán lo siguiente: 1) las colaboraciones que deben ser reconocidas pero que no justifican la

autoría, tales como el apoyo general del jefe del departamento; 2) el reconocimiento por la ayuda técnica recibida; 3) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; y 4) las relaciones que puedan suscitar un conflicto de intereses (véase «Conflicto de intereses»).

Las personas que colaboraron intelectualmente en el artículo pero cuya participación no justifica la autoría pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo, «asesoramiento científico», «examen crítico de la propuesta para el estudio», «recolección de los datos» o «participación en el ensayo clínico». Estas personas tendrán que conceder su permiso para ser nombradas. Los autores se responsabilizarán de obtener la autorización por escrito de las personas mencionadas por su nombre en los agradecimientos, pues los lectores pueden inferir que estas respaldan los datos y las conclusiones.

El reconocimiento por la ayuda técnica recibida figurará en un párrafo separado de los testimonios de gratitud por otras contribuciones.

## Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafos de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Emplee el estilo de los ejemplos que aparecen más adelante, los cuales están basados en el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente como parte del número de enero y como separata. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web (<http://www.nlm.nih.gov>).

Absténgase de utilizar los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación. La información proveniente de manuscritos presentados para publicación pero aún no aceptados se citará en el texto como «observaciones inéditas», con el permiso correspondiente de la fuente.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto. En el caso de artículos científicos, los autores deberán obtener el permiso de la fuente y su confirmación de la exactitud de la comunicación personal, ambos por escrito. Los autores verificarán las referencias cotejándolas contra los documentos originales.

El estilo de los requisitos uniformes (estilo de Vancouver) se basa en gran medida en una norma de estilo ANSI adaptada por la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) para sus bases de datos. En los ejemplos que siguen se han agregado notas cuando el estilo de Vancouver difiere del estilo que actualmente utiliza la NLM.

**Artículos de revista**

*1. Artículo de revista ordinario*

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión «et al.» (Nota: La NLM incluye ahora hasta 25 autores; si hay más de 25, enumera los primeros 24, continuación el último autor y luego agrega «et al.»)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1;124(11):980-3.

Optativamente, si se utiliza la paginación continua a lo largo de un volumen (como hacen muchas revistas médicas), se pueden omitir el mes y el número.

(Nota: Para respetar la uniformidad, en todos los ejemplos que se presentan en los requisitos uniformes se aplica esta opción. La NLM, sin embargo, no usa dicha opción.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

*Más de seis autores:*

Parkin DM, Clayton D, Black Rj, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.

*2. Organización como autor*

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

*3. No se indica el nombre del autor*

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

*4. Artículo en idioma extranjero (2)*

(Nota: La NLM traduce el título al inglés, lo encierra entre corchetes y le agrega la abreviatura correspondiente al idioma original.)

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hos tidligere frisk kvinne. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1996; 116:41-2.

*5. Suplemento de un volumen*

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

*6. Suplemento de un número*

Payne DK, Sullivan MD, Massie Mj. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2): 89-97.

*7. Parte de un volumen*

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

*8. Parte de un número*

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

*9. Número sin volumen*

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320): 110-4.

*10. Sin número ni volumen*

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responsos. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

*11. Paginación en números romanos*

Fisher GA, Sikic BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

*12. Indicación del tipo de artículo, según corresponda*

Enzensber er W, Fischer PA. Metronome in Parkinson,s disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

*13. Artículo que contiene una retractación*

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. En: *Nat Genet* 1994;6:426-31]. *Nat Genet* 1995;11: 104.

---

(2) Evidentemente "extranjero" se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencia bibliográfica se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos (N. Del t.).

14. *Artículo retirado por retractación*

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado por retractación en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3127]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:1083-8.

15. *Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas*

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en West J Med 1995;162:278]. West J Med 1995; 162:28-31.

**Libros y otras monografías**

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser.)

16. *Individuos como autores*

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. *Directores ("editores"), compiladores como autores*

Norinan JJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

18. *Organización como autor y editorial*

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

19. *Capítulo de libro*

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver prescribía el uso de dos puntos en vez de la letra p antes de las páginas.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

20. *Actas de conferencias*

Kimura j, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology, Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

21. *Artículo presentado en una conferencia*

Bengtsson S, Tolheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. En: Lun KC, Dégoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. *Informe científico o técnico*

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora:  
Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:

Field MjJ Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. *Tesis doctoral*

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

24. *Patente*

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.

**Otros trabajos publicados**

25. *Artículo de periódico*

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. *Material audiovisual*

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. *Documentos legales*

Ley pública:  
Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sess. (1995).

Código de normas federales:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

28. *Mapa*

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. *Libro de la Biblia*

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. *Diccionarios y obras de consulta semejantes*

Stedman's medical dictionary, 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. *Obras clásicas*

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

**Trabajos inéditos**32. *En prensa*

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

**Material en soporte electrónico**33. *Artículo de revista en formato electrónico*

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 5];1(1):[24 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

34. *Monografía en formato electrónico*

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

35. *Fichero de computadora*

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

**Cuadros**

Mecanografía o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada

columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilídense los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: \*, †, ‡, †, \*\*, ††, ††.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media.

No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros. Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento cabal que corresponde. Incluir un número excesivo de cuadros en relación con la extensión del texto puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas. Examine varios números recientes de la revista a la que planea presentar el artículo y calcule cuántos cuadros pueden incluirse por cada millar de palabras de texto. Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que los cuadros suplementarios que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensos para publicarlos, queden depositados en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionados por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos cuadros se presentarán junto con el artículo para su consideración.

**Ilustraciones (figuras)**

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma. No escriba directamente sobre el dorso de las figuras ni las sujete con broches para papel, pues quedan marcadas. Las figuras no se doblarán ni se montarán sobre cartón.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en estas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quién sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

**Pies o epígrafes de las ilustraciones**

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

**Unidades de medida**

Las medidas de longitud, talla, *peso* y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiples y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

**Abreviaturas y símbolos**

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

**Envío del manuscrito a la revista**

Envíe por correo el número requerido de copias del manuscrito en un sobre de papel resistente; si es necesario, proteja las copias y las figuras metiéndolas entre dos hojas de cartón para evitar que las fotografías se doblen. Meta las fotografías y transparencias en su propio sobre de papel resistente.

Los manuscritos irán acompañados de una carta de envío firmada por todos los coautores.

**Artes Finales:** Amerik Solutions C.A., Caracas, Venezuela  
Teléfono (02) 993.81.43

**Portada:** Chávez & López, Diseño Gráfico, Caracas, Venezuela  
Teléfono (02) 285.55.29

**Impresión:** Editorial Texto C.A., Caracas, Venezuela  
Teléfonos: (02) 632.97.17 - 632.74.86

# Sociedad Latino Americana de Nutrición

## S.L.A.N.

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN) fue creada con el fin de integrar los esfuerzos de profesionales calificados para promover y mejorar el conocimiento de los problemas nutricionales de los países de la región y de las alternativas de prevención y tratamiento que ofrece la nutrición como ciencia.

Cualquier persona que se encuentre profesionalmente activa o que haya contribuido de manera significativa al avance de la nutrición o disciplinas afines, puede asociarse a SLAN, para lo cual debe enviar una carta de solicitud avalada por dos Socios Activos y su Curriculum actualizado. Debe igualmente anexar la documentación que pruebe la publicación de por lo menos, dos trabajos, en revistas de nivel internacional en los últimos años.

La solicitud debe dirigirse a la Presidencia de la SLAN en Ribeirao Preto, Brasil o a los Capítulos de la SLAN en los respectivos países. El actual Consejo Directivo de la SLAN está integrado por Helio Vannucchi (Presidente), Eduardo Atalah Samur (Vicepresidente), Julio Sergio Marchini (Secretario General), Pedro Eder Portari Filho (Tesorero) y Adolfo Chávez Villasana (Presidente Saliente).

El órgano oficial de la divulgación de la SLAN es "Archivos Latinoamericanos de Nutrición", ALAN, continuación de "Archivos Venezolanos de Nutrición". Los manuscritos para considerar su publicación deben ser dirigidos al Editor General José Félix Chávez Pérez o al Editor Asociado Maritza L. de Jiménez.

Los socios deben cancelar una cuota anual de U.S. \$ 40, la cual incluye la suscripción a la revista.

La correspondencia destinada a la SLAN debe dirigirse a Helio Vannucchi, Facultad de Medicina de Ribeirao Preto, Universidad de Sao Paulo, Ave Bandeirantes 3.900, CEP 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brasil. La destinada a ALAN, se dirigirá a la dirección de la revista que figura en la primera contraportada o a su dirección electrónica: alanven04@hotmail.com

¿CAMBIO DE DOMICILIO?

¿CHANGING YOUR ADDRESS?

Por favor, escriba su dirección abajo y envíela al Departamento de Suscripciones de ALAN, adjuntando la etiqueta de un sobre de envío. Le rogamos avisarnos con 60 días de anticipación./  
**Please print your new address below and return to the Journal Subscription Dept. with our label. Please advise 60 days in advance.**

Nombre/Name:

Calle/Street:

Ciudad/City:

Estado, País/State, Country:

Código Postal/Postal Code:

Por favor enviar ALAN a mi nueva dirección a partir de/ **Date new address effective:**



# Sociedad Latino Americana de Nutrición

S.L.A.N.

## SOLICITUD DE INSCRIPCION

Nombre: _____	
Título Profesional: _____	
Estudios de Postgrado: _____	
Cargo: _____	
Institución donde trabaja: _____	
Dirección: _____	
Código Postal: _____ Ciudad/País: _____	
Teléfono: _____ Fax: _____ Correo electrónico: _____	
Fecha de solicitud:     /     /	
<b>Anote las referencias bibliográficas de dos de sus publicaciones más recientes</b>	
1. _____	
_____	
2. _____	
_____	
<b>Socios de SLAN que le postulan</b>	
Nombre:	Firma:
_____	_____
_____	_____

Adjunte su Curriculum Vitae actualizado.

La cuota anual de SLAN es de \$ 40 con la revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición.  
Los cheques deben ser emitidos en U.S. \$ a nombre de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.