

ALAN

Volumen 54. N° 1. Marzo 2004

ARCHIVOS

Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

LATINOAMERICANOS

Continuación de Archivos Venezolanos de Nutrición

DE NUTRICION



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

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

Dirección: Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Apartado 62.778. Chacao.

Caracas 1060. Venezuela, S.A.




Fax (58.212) 286.00.61

Ubicación en formato digital: <http://www.scielo.org.ve>

Correo electrónico: alanven04@hotmail.com

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION está registrado en ASEREME e indizado en las siguientes Bases de Datos: LILACS/CD ROM; Food Science & Technology Abstracts; MEDLINE, Life Science Collection; Science Citation Index

ENTIDADES PATROCINANTES

- **FONACIT**, Venezuela
- **Fundación para la Alimentación y Nutrición “José María Bengoa”**
Caracas, Venezuela
- **Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)**
Guatemala, Guatemala C.A.
- **INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION**, Venezuela
-  **Hello y's** América Latina
-  **PRODUCTOS ROCHE**, América Latina
- **Fundación POLAR**
- **Centro de Atención Nutricional Infantil Antfmano. CANIA**
- **PARMALAT** de Venezuela
- **ADM Protein Specialties**
- **Coca-Cola** de Venezuela
-  **Kraft Foods**
Kraft Foods Venezuela, C.A.

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION se complace en destacar y agradecer el apoyo económico recibido del FONACIT para la edición sostenida de la revista.

Bajo la responsabilidad del Capítulo Venezolano de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 54

MARZO 2004

Nº 1

Contenido

	Páginas
EDITORIAL	5
XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición	6
ARTICULOS GENERALES	
Nuclear and isotopic techniques application used in supporting nutritional studies in Latin America countries	
N. Mokhtar, J. Gerardo-Abaya, B. Miranda da-Cruz, Seong-Ai Kim, G.V. Iyengar	9
La pica durante el embarazo: un trastorno frecuentemente subestimado	
Laura Beatriz López, Carlos Rafael Ortega Soler, María Luz Pita Martín de Portela	17
Lactação e álcool: Efeitos clínicos e nutricionais	
Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos, Francisca Martins Bion, Florisbela Campos	25
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Nutrición Humana	
Papel del frijol negro <i>Phaseolus vulgaris</i> en el estado nutricional de la población guatemalteca	
José Serrano e Isabel Goñi	36

Prematurity and maternal folate deficiency: Anemia during pregnancy study group results in Valencia, Venezuela Arturo Martí-Carvajal, Guiomar Peña-Martí, Gabriella Comunán-Carrasco, Sergio Muñoz-Navarro, Mariana Luco, BChem, Arturo Martí-Peña, Carolina Medina-Laurentín	45
Nutrición Experimental	
Índice epidemiológico de nutrición infantil basado en un modelo polinomial de los valores de puntuación Z del peso para la edad Avila-Curiel A., Shamah T, Barragán L, Chávez A., Avila MA., Juárez L.	50
Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos Larissa Ribeiro Braga, Maria Alice Rostom de Mello, Claudio Alexandre Gobatto	58
Alimentación Complementaria	
Evaluación del impacto nutricional del programa de alimentación complementaria de Panamá en niños menores de 5 años Eira de Caballero, Odalis Sinisterra, Francisco Lagrutta, Eduardo Atalah S.	66
Inocuidad de Alimentos	
Diseño de un plan de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) para el aseguramiento de la inocuidad de la mortadela elaborada por una empresa de productos cárnicos Lizet Bou Rached, Norelis Ascanio, Pilar Hernández	72
Ciencia de Alimentos	
Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de <i>Phaseolus lunatus</i> L. Santiago Gallegos Tintoré, Jessé Pacheco Aguirre, David Betancur Ancona y Luis Chel Guerrero	81
Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente Lorena R. Agostini, María J. Morón Jiménez, Adriana N. Ramón, Antonio Ayala Gómez	89
Tecnología de Alimentos	
Caracterización de galletas elaboradas con cascarrilla de orujo de uva Rafael Canett Romero, Ana Irene Ledesma Osuna, Rosario Maribel Robles Sánchez, Rafael Morales Castro, Liliana León-Martínez, Rosaura León-Gálvez	93
LatinFoods. Composición de Alimentos	
El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes Cynthia Cristina Arcila-Lozano, Guadalupe Loarca-Piña, Salvador Lecona-Uribe y Elvira González de Mejía ..	100
Effects of different thermal treatments and storage on the proximate composition and protein quality in canned tuna García-Arias M.T, Navarro M.P., García-Linares M.C.	112
Calcium and magnesium concentrations in mature human milk: influence of calcium intake, age and socioeconomic level Vítolo M.R., Valente Soares L.M., Carvalho E.B., Cardoso C.B.	118
INFORMACION PARA LOS AUTORES	123

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 54

MARCH 2004

Nº 1

Contents

	Pages
EDITORIAL	5
XIII Latin American Congress of Nutrition	6
GENERAL ARTICLES	
Nuclear and isotopic techniques application used in supporting nutritional studies in Latin America countries	
N. Mokhtar, J. Gerardo-Abaya, B. Miranda da-Cruz, Seong-Ai Kim, G.V. Iyengar	9
Pica during pregnancy: a frequently underestimated problem	
Laura Beatriz López, Carlos Rafael Ortega Soler, María Luz Pita Martín de Portela	17
Lactation and alcohol: Clinical and nutritional effect	
Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos, Francisca Martins Bion, Florisbela Campos	25
RESEARCH PAPERS	
Human Nutrition	
Effects of black bean <i>Phaseolus vulgaris</i> consumption on the nutritional status of Guatemalan population	
José Serrano e Isabel Goñi	36

Prematurity and maternal folate deficiency: Anemia during pregnancy study group results in Valencia, Venezuela Arturo Martí-Carvajal, Guiomar Peña-Martí, Gabriella Comunán-Carrasco, Sergio Muñoz-Navarro, Mariana Luco, BChem, Arturo Martí-Peña, Carolina Medina-Laurentín	45
Experimental Nutrition	
An epidemiological index to assess the nutritional status of children under five years of age in Mexico Avila-Curiel A., Shamah T., Barragán L, Chávez A., Avila MA. Juárez L	50
Continuous and intermittent exercise: effects of training and detraining on body fat in obese rats Larissa Ribeiro Braga, Maria Alice Rostom de Mello, Claudio Alexandre Gobatto	58
Complementary Foods	
Assessment of the nutritional impact of the complementary feeding program of Panama in children under five years old Eira de Caballero, Odalis Sinisterra, Francisco Lagrutta, Eduardo Atalah S.	66
HACCP	
Design of a Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) Plan to assure the safety of a bologna product produced by a meat processing plant Lizet Bou Rached, Norelis Ascanio, Pilar Hernández	72
Food Science	
Extraction and characterization of soluble protein fractions from <i>Phaseolus lunatus</i> L seeds Santiago Gallegos Tintoré, Jessé Pacheco Aguirre, David Betancur Ancona and Luis Chel Guerrero	81
Determination of the antioxidant capacity of flavonoids in fruits and fresh and thermically treated vegetables Lorena R. Agostini, María J. Morón Jiménez, Adriana N. Ramón, Antonio Ayala Gómez	89
Food Technology	
Characterization of cookies made with deseeded grape pomace Rafael Canett Romero, Ana Irene Ledesma Osuna, Rosario Maribel Robles Sánchez, Rafael Morales Castro, Liliana León-Martínez, Rosaura León-Gálvez	93
LatinFoods. Food Composition	
Oregano: Properties, composition and biological activity Cynthia Cristina Arcila-Lozano, Guadalupe Loarca-Piña, Salvador Lecona-Uribe and Elvira González de Mejía	100
Effects of different thermal treatments and storage on the proximate composition and protein quality in canned tuna García-Arias M.T, Navarro M.P., García-Linares M.C.	112
Calcium and magnesium concentrations in mature human milk: influence of calcium intake, age and socioeconomic level Vítolo M.R., Valente Soares L.M., Carvalho E.B., Cardoso C.B.	118
INFORMATION FOR AUTHORS	123

EDITORIAL

Prezados socios

Os problemas relacionados à Nutrição são, na América Latina, amplos e complexos e por isso requerem dos profissionais, atenção especial e muita dedicação.

Assumimos, em janeiro a Diretoria da SLAN com o compromisso de estimular a extensão e disseminação de conhecimentos no campo de Nutrição e disciplinas afins; propiciar o contacto entre investigadores da área com o propósito de analisar e propor soluções para os problemas nutricionais da América Latina. Assim como os problemas são variados, também sabemos da militância de profissionais da mais alta competência entre nós e vale a pena o esforço para congregá-los oferecendo oportunidades de discussão e encaminhamento de soluções técnicas e científicas.

Desta forma envidaremos esforços para promover reuniões científicas regionais com objetivo de discutir e estimular os programas em andamento nos respectivos países, especialmente facilitando o intercâmbio profissional. Além disso, importa muito difundir o ensino e educação em Nutrição em nosso continente. Ao final do ano de 2006 (novembro), esta diretoria se encarregará de promover o XIV Congresso Latino americano de Nutrición, em Florianópolis, no Estado de Santa Catarina, na Região Sul do Brasil. Para isto deverá utilizar-se das discussões regionais como base para que os temas sejam propostos sem olvidar os aspectos mais atuais do progresso científico e tecnológico. Gostaríamos de contar com os **Vocales Regionales** para que sejam participantes ativos na organização e difusão das reuniões de nossa sociedade.

Consideramos importante, também, ampliar o quadro de **Sócios** (Activos, de Mérito, Adjuntos, Honorários y Estudiantes) para consolidar a representação da comunidade científica da nossa região.

Uma das formas de estreitar os contactos dos sócios e profissionais da área é sem duvida proporcionado pelos **Archivos Latinoamericanos de Nutrición - ALAN**.

A atual diretoria da SLAN considera de grande relevância reafirmar a importância e abrangência da difusão científica feita por seu intermédio. Interessa que **ALAN** consiga atrair a produção científica da melhor qualidade e veicular com regularidade e pontualidade os artigos científicos da área e represente com dignidade os pesquisadores em Nutrição da América Latina, como, de fato, já vem sendo feito há décadas. Convocamos os membros da **SLAN** a prestigiar com prioridade seu veículo de difusão científica fortalecendo e ampliando o impacto da nossa revista científica.

Saludos

Helio Vannucchi
Presidente- SLAN

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo - Brasil
hvannucc@fmrp.usp.br

XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición

El XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición tuvo lugar del 9 al 13 de Noviembre de 2003 en Acapulco, México. En este Congreso – el segundo que se celebra en México, el V tuvo lugar en Puebla en 1980 – se sucedieron eventos de relevancia, dos de los cuales deseamos comentar en esta ocasión. Estos eventos son: el merecido reconocimiento a un distinguido científico y el homenaje a Socios Eméritos de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN.

Premio Internacional Danone para la Nutrición. De reconocido prestigio y excelencia, creado en 1997 por el Instituto Danone, éste Premio se otorga por primera vez a un investigador latinoamericano, en esta ocasión a Ricardo Bressani Castignoli, guatemalteco de brillante y dilatada trayectoria profesional, quien recibió el merecido galardón en emotiva ceremonia celebrada el Martes 11 de Noviembre a las 20:00 hrs. en el Fuerte de San Diego, Acapulco. El presidente del Comité Organizador del Premio Internacional Danone para la Nutrición, 2003, José Eduardo Dutra de Oliveira, expuso en sus palabras de apertura: “En la actualidad en todo el mundo se llevan a cabo proyectos de investigación básica y programas de nutrición aplicada, basados en métodos científicos, para superar el reto de lograr una alimentación mas adecuada para la población mundial. ¡ Debemos asumir ese reto ! El Premio Internacional Danone para la Nutrición al promover la ciencia de la nutrición como una disciplina aplicada y multidisciplinaria contribuye a esta meta”.

Homenaje a Socios Eméritos. En el marco de un sencillo pero sentido acto que tuvo lugar en el Teatro Juan Ruiz de Alarcón del Centro de Convenciones de Acapulco, el Miércoles 12 en horas del mediodía, la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN, rindió un merecido homenaje a sus Socios Eméritos siguientes: Guillermo Arroyave, Moisés Béhar, José María Bengoa, Ricardo Bressani, Carlos Hernán Daza, José Eduardo Dutra de Oliveira, Marina Flores, Wilma Freyre, Silvestre Frenk, John Gay, Jean Pierre Habicht, Susana J. Icaza, Werner G. Jaffé, Alfredo Lam Sánchez, Fernando Monckeberg, Ernesto Pollitt, Juan Claudio Sanahuja, Nevin Scrimshaw y Fernando Viteri.

Durante la celebración de esta ceremonia merece destacar la agradable sorpresa ofrecida por el Comité Organizador del XIII Congreso. En efecto, en mitad del acto pudimos escuchar directamente y en vivo por conferencia telefónica, las palabras pronunciadas con emocionada voz por José María Bengoa, Guillermo Arroyave, Juan Claudio Sanahuja y

Werner Jaffé. Seguidamente se propuso que el nombre de Adolfo Chávez Villasana, Presidente del XIII Congreso, debía integrarse a la lista de Miembros Eméritos, proposición que fue aceptada por unanimidad.

A continuación reproducimos por solicitud expresa recibida en fecha reciente, oportuna y por demás muy grata, las palabras pronunciadas por Juan Claudio Sanahuja en su breve intervención telefónica:

“Señoras, Señores, Congresistas. Les está hablando Juan Claudio Sanahuja desde Buenos Aires, que lamenta profundamente no estar allí con Uds. compartiendo este Congreso de la SLAN. Quiero que mis primeras palabras sean para hacer llegar un saludo muy afectuoso a todos los amigos de la SLAN y en general a todos los asistentes a este evento internacional. Vaya también mi mas íntimo reconocimiento a las autoridades de la Sociedad, que personalizo en su Presidente el Dr. Adolfo Chávez por esta distinción que me acaba de otorgar, y que me honra a la vez que me emotiva intimamente”.

“Pero, en una reflexión mas profunda pienso que este homenaje debiera haber sido a la inversa y que, al menos en mi caso, ser yo quien lo tributara a la SLAN por todo lo que de ella he recibido. En efecto fue su aura, su riqueza espiritual, su fuerza moral, su potencial científico, valores muy caros a mi espíritu que comencé a percibir en el 1er. Congreso realizado en Caracas y que me conquistaron definitivamente cuando participé en la “Reunión sobre Recursos Proteínicos en América Latina” que organizó el INCAP en Guatemala en 1970. Fueron esos valores los que me hicieron comprender la necesidad de ampliar el campo de la Nutrición, en cuyo perfil básico, esencialmente bioquímico, me había formado años antes en Wisconsin, con un brillante maestro, el Dr. Alfred Harper. Comprendí entonces que esa área, Nutrición bioquímica, debería ser ampliada y extendida hacia la Nutrición aplicada, para ser capaz de resolver los problemas de la alimentación de la gente, de nuestro prójimo y en especial los de aquellos mas vulnerables, paradójicamente, los mas desprotegidos social, cultural y económicamente, nuestros niños, nuestros queridos niños de Latinoamérica”.

“Ese Continuum de la Nutrición, la explicité en el 1er. Congreso de Proteínas Alimenticias realizado en Buenos Aires en 1970 y en las Conferencias “Malnutrición infantil, sus proyecciones sociales” publicada en la Ciencia e Investigación, en Buenos Aires (1972) y Nutrición, ciencia bioquímica y ciencia social que publicó Interciencia en Caracas en 1976. A la consecución de esos objetivos se dirigió

todo mi empeño y todo mi conocimiento, logrando la creación de la Cátedra de Nutrición, anexa a la Ciencia de los Alimentos, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y concretando la formación de un grupo de investigadores cuya contribución fue y sigue siendo de alta relevancia internacional, con los cuales creamos el Capítulo Argentino de la SLAN”.

“Todo ello, pero en especial la generosidad de los directores de la SLAN me llevaron a la presidencia de la misma entre 1980-1982 y a la del VI Congreso Latinoamericano realizado en Buenos Aires, en el cual como en los anteriores, fueron su motor esas brillantes figuras “eslancistas”, verdaderos “numen” y pilares de la Sociedad, cuyos nombres son bien conocidos: Scrimshaw, Monckeberg, Dutra de Oliveira, Jaffé, Bacigalupo, Bengoa, Bressani, M.A. Tagle, Viteri, Bourges y otros muchos que sería largo enumerar”.

“Y termino: A la SLAN y a todas esas personalidades con las que tuve el honor y el gusto de colaborar y que me brindaron una amistad perdurable, otra vez muchas gracias y que ese ejemplo ilumine a todos los jóvenes que con la mirada puesta en América Latina, comparten hoy esos mismos ideales y persiguen idénticos objetivos. Gracias y hasta cuando Dios quiera”.

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION siente especial placer en hacer llegar su palabra de felicitación y genuino reconocimiento, tanto a Ricardo Bressani Castignoli, recipiente del Premio Danone, como a todos y cada uno de los Eméritos por tan lograda y merecida distinción. Gracias y Dios mediante, nos vemos en Florianópolis en 2006.

José Félix Chávez Pérez
Editor General

Nuclear and isotopic techniques application used in supporting nutritional studies in Latin America countries

N. Mokhtar, J. Gerardo-Abaya, B. Miranda da-Cruz, Seong-Ai Kim, G.V. Iyengar

International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria - Department of Food and Nutrition,
Chungnam National University, Korea

SUMMARY. The global nutrition community recognizes the usefulness of nuclear and isotopic techniques and especially stable isotopes for accurate measurements in key areas of human nutrition and health. Although progress has been made in many Latin America countries in reducing the absolute number of undernourished people, food policy and public health communities have to face the double burden on health. On one side they have to address the prevention of obesity and on the other side they are trying to reduce under-nutrition. However, to be successful in development of sustainable nutrition programs, a combination of relevant scientific knowledge and approaches that are practical is required to assure even a reasonable level of success. The objectives of this review are to highlight the role of isotopic techniques in nutritional studies and to review the role of the International Atomic Energy Agency in supporting nutrition interventions in Latin America countries.

Key words: Nutrition, stable isotopes, Latin America.

RESUMEN. Uso de técnicas nucleares y especialmente de isótopos estables en el soporte de estudios de nutrición humana en los países de América Latina. La comunidad global de la nutrición reconoce la utilidad de técnicas nucleares e isotópicas y especialmente de isótopos estables para las medidas exactas en las áreas dominantes de la nutrición humana y de la salud. Aunque se ha progresado en muchos países de América Latina en la reducción del número absoluto de desnutridos, la política alimentaria y las comunidades de la salud pública, tienen que hacer frente a la carga doble en la salud. Por un lado se tiene que tratar la prevención de la obesidad y, por otro lado, se está intentando reducir la malnutrición y la pobreza. Para ésto, el conocimiento científico relevante y el arte de la práctica son necesarios para ser acertados en el desarrollo de los programas sostenibles de la nutrición. Los objetivos de esta revisión son destacar el papel de técnicas isotópicas en estudios nutricionales y revisar el papel del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) en la intervención y soporte del estado de la nutrición en los países de América Latina.

Palabras clave: Nutrición, isótopos estables, América Latina.

INTRODUCTION

Latin America countries are experiencing an epidemiological overlap as part of the so-called nutrition epidemiological transition. Indeed, as shown in Table 1, in many countries of the region, a high incidence of nutritional deficiencies and infections coexist with obesity and non-communicable diseases. Stunting affects 13-24% of Latin American children while more than one-third of the adult population, mostly women, are experiencing overweight and obesity health risks (1,2). Moreover, the WHO World Health Report (3) shows clearly (Table 2) that in developing countries with low mortality, such as most countries in Central and South America, under nutrition and obesity are among the five risk factors leading to disability and death (3).

Although progress has been made in many Latin America countries in reducing the absolute number of undernourished people, food policy and public health communities have to face the double burden on health. These countries have to address the prevention of obesity and simultaneously they

need to reduce under nutrition.

TABLE 1
Percentage of children in malnutrition conditions
and percentage of women overweight/obesity in some
Latin America countries

Countries	% of under five children who are underweight	% of under five children who are stunted	Overweight and obesity level (%) in women 15-49 years
Bolivia	10	26	33.8
Brazil	6	11	35
Colombia	7	14	40.6
Dominican Rep.	5	6	48.1
Ecuador	15	27	-
Guatemala	24	46	34.2
Mexico	8	18	33.5
Peru	7	25	44.9
Chile	1	2	-

Source: (1,2)

The Bellagio Declaration (3) on the nutrition transition in the developing world stressed on the need for initiatives that provide technical support in the programme evaluation and cost effective assessments of existing and new programs and interventions to control malnutrition at national and regional levels.

TABLE 2

Leading 10 selected risk factors as percentage causes of Disease burden measured in DALYs in low mortality countries (e.g. Latin America countries)

Factors	DALYs in %
Alcohol	16.2
Blood pressure	5.0
Tobacco	4.0
Underweight	3.1
Overweight	2.7
Cholesterol	2.1
Low fruit & vegetable intake	3.9
Indoor smoke from solid fuels	1.9
Iron deficiency	1.8
Unsafe water, sanitation & hygiene	1.8

DALYs: Disability adjusted life in years. One DALY is equal to one healthy year of life lost. Source: (2)

However, to be successful in the development and implementation of sustainable nutrition programs, a combination of relevant scientific knowledge and practical approaches are required to assure a reasonable level of success. Reviewing and evaluating nutrition intervention thus need reliable and cost effective tools. These allow the policy makers to adopt sound sustainable strategies.

The global nutrition community recognizes the usefulness of nuclear and isotopic techniques and especially stable isotopes for accurate measurements in key areas of human nutrition and health: assessment of nutritional status, nutrient uptake and bioavailability, nutrients requirements, micronutrient malnutrition, food analysis, etc. (4).

The objectives of this review are to highlight the role of isotopic techniques in nutritional studies in general and to review the role of the International Atomic Energy Agency in supporting nutrition interventions in Latin America in particular.

Nuclear and isotopic techniques applied to human nutrition: A brief overview

Stable isotopes do not emit radiation and hence can be safely utilized in human studies and are particularly useful in human nutrition. There are two forms of isotopic tracers: radioactive and stable.

Radioactive isotopes can be detected via radiation they emit. They have many important applications, such as measurements of body composition, uptake and bioavailability of nutrients and with ^{14}C -urea breath test to examine bacterial colonization by *Helicobacter pylori*. However, the risk of radiation related health effects overtime has dampened the use of radiotracers in human subjects.

Stable isotopes on the other hand are invaluable since there are virtually no health risks associated with their use. Therefore they are preferred for work in humans, especially in infants, children and pregnant women. Many naturally occurring elements exist as a mixture of two or more stable non-radioactive isotopic forms. There are the heavy stable isotopes (e.g. ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe , ^{58}Fe , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{68}Zn , ^{70}Zn) and light stable isotopes (e.g. ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{12}C , ^{15}N , ^{14}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O).

The main advantages and disadvantages of these two forms of isotopic tracers are summarized in Table 3.

TABLE 3

Advantages and disadvantages radioactive and stable isotopes

Isotopes Utility	Radioisotopes	Enriched Stable Isotopes
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> - authentic tracers - easily detectable - generally inexpensive - sample preparation minimal - whole body measurement, retention can be determined 	<ul style="list-style-type: none"> - minimal health risk, can be used in infants, pregnant and lactating women - multi-elements procedure - tracers may be followed for longer periods - samples can be stored without loss of tracers - reanalysis possible
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> - safety concerns, some risk through exposure to radiation - unsuitable for infants and children, pregnant and lactating women - decay time - only one radioactive element can be studied - sample analysis must be timed based on half-life - expensive waste problem 	<ul style="list-style-type: none"> - not true tracers, larger amount needed - expensive - extensive sample preparation - still complex and costly analysis - direct determination of retention not possible

Source: (5).

Some examples of the application of stable isotope applications in human nutritional studies are as follow:

Estimation of total energy expenditure

Energy expenditure data can be used to strengthen the

base for public health policy. The doubly labeled water (DLW) method determines the caloric expenditure of people in their normal environment. It is accurate and can be applied under field conditions. After administration of a sample dose of double-labeled water $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$ both isotopes equilibrate with total body water and are eliminated differentially in body fluids over a period of days. Deuterium (^2H) leaves the body as water and ^{18}O leaves it as water and CO_2 . Thus, the difference rate of loss of the two isotopes ^2H and ^{18}O is used to calculate CO_2 production of the subject, which in turn, is used to calculate energy expenditure (6).

Estimation of lean body mass (body composition)

There is a growing consensus among global nutrition experts that evaluating body composition in children and adults will help in designing strategies to improve national health profiles, which is an important step in targeting health and nutrition intervention. A trace dose of water labeled with ^2H or ^{18}O is administered and allowed to equilibrate for 4-6 hours. Isotope enrichment in urine or saliva samples is measured to calculate body water volume. Total body water is used to quantify fat-free mass. Body composition is calculated from measured body water and the hydration coefficient of fat-free mass. The amount of fat (adipose) tissue is calculated as the difference between total body weight and lean body mass (7). Exact measurements of lean mass and fat mass are very useful to assess under nutrition and obesity in populations at risk. In addition, lean body mass can be considered a valuable indicator to monitor body wasting in HIV/AIDS patient, which shows a decrease in lean body mass. An increased in energy expenditure also is seen when compared to HIV negative subjects (8).

Measurement of breast milk intake

Measurement of breast milk intake is fundamental for infant nutrition in developing countries since it is well known that early introduction of weaning foods is an important cause of child malnutrition. The isotope dilution method does not interfere with feeding behavior and is therefore suitable for nutritional studies in developing countries. The mother given dose of ^2H or ^{18}O labeled water, which mixes with the body water pool and is transferred to the baby via breast milk. By collecting samples of the mother's saliva or milk and the baby's saliva or urine, the breast milk intake of the baby can be calculated (9).

Trace element bioavailability

The uptake and metabolism of labeled micronutrients can be traced in vivo. In fact, stable isotopes provide the most acceptable way of measuring the uptake and bioavailability of trace elements in humans (10).

Analysis of food

Neutron activation analysis (NAA) is a highly sensitive method for the accurate determination of up to 60 elemental concentrations in material. Sensitivities are sufficient to measure certain elements at the nanogram level and below. The NAA method is based on the detection and measurement of characteristic gamma rays emitted from radioactive isotopes produced in the sample upon irradiation with neutrons. The technique requires only small amounts of sample material - 100 to 200 milligrams and it is also not necessary to do any sample preparation other than size reduction and (in some cases) drying, making the technique non-destructive. Application of NAA-related methods is particularly attractive for developing countries since many research reactors are available to provide the needed neutron source (11). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) also offers multi-element determinations.

Osteoporosis

Measuring bone mass is essential to diagnosing and managing osteoporosis and related issues of bone metabolism. DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) is now the standard technique for measuring bone mass density. Low energy X-rays are passed through the bones to measure the mineral particularly calcium content of the bones. The precision of DEXA is very high and the data can be standardized for age, weight, height and ethnic status (12).

Detection of infection

The use of the stable isotope in ^{13}C -urea breath test, instead of ^{14}C -urea, has recently been applied to detect *Helicobacter pylori* infection in humans. Breath is collected for a base value before a ^{13}C labeled urea is administered. The enzyme urease of *H. pylori* breaks down the urea into ammonium and labeled bicarbonate. The latter compound will be metabolized by the person into carbon dioxide and expired. After 20-30 minutes a second breath sample is collected and measured for ^{13}C (13).

The role of the IAEA in supporting nutritional studies using nuclear and related techniques

The International Atomic Energy Agency (IAEA), as an independent intergovernmental, science and technology-based organization in the United Nations family, provides assistance in the use of nuclear science and technology for peaceful applications and facilitates the transfer of nuclear technology and knowledge in a sustainable manner to its Member States. One of its programmes focuses on human health, specifically for the use of isotopes or nuclear related

techniques to evaluate human nutritional status and the nutritional quality of foods. Through this programme, the IAEA offers technical support via coordinated research projects (CRPs) and technical cooperation projects (TCP) (14) to evaluate the efficacy of fortified food supplementation initiatives and other interventions aimed at fighting many forms of malnutrition. It is a partner in addressing nutrition and health problems in more than 50 countries in collaboration with Member States, other United Nations organizations and donors.

Coordinated Research Projects (CRPs)

A Coordinated Research Project (CRP) is a mechanism by which group of countries are brought together to work on a well-defined research topic for an average duration of 3 years. Modest annual funding is made available to developing countries mainly for sample collection and analysis. As a crucial part of a CRP, collaboration between scientists from developing and developed countries is stimulated and exchanges of information are encouraged through participation at the research coordination meetings (RCM) funded by the IAEA.

Recently, the T-CRP (Thematic CRP or Doctorate CRP) a new type of CRP has been introduced that is dedicated to the support of PhD students. This increases the scope of a normal CRP for capacity building in developing countries. Pairs of countries (developed and developing countries) are stimulated to work together. The program promotes postgraduate training in the student's country of origin and supports the possibility of short training in a developed country. The T-CRP has a longer duration up to 4-5 years, and has an increased level of funding through traditional CRPs.

The Technical Cooperation Programme (TCP)

The Technical Cooperation Programme (TCP) support socio-economic goals to Member States based on their respective national development priorities and relevant nuclear applications. It promotes the transfer of known technology that has been used in the Agency and addresses priority problems identified by Member States and ensure its support through the TC programme is strategically planned for maximal impact generation. Unlike CRPs that focus on research for development of tools and techniques, the TCP covers projects relevant to proven nuclear techniques that are ready for practical applications and can contribute to the solutions of field or development problems.

The TCP responds to project requests received from Members States by applying of appropriate criteria for project formulation and appraisal according to the TC strategy and Management Principles and by securing formal approval by

the IAEA Board of Governors. These criteria include strong government support and patronage priority areas for national development. Requests must be linked directly to end-users, which in the case of nutrition projects are usually public health institutes that can implement recommendations that result from funded projects and use project results to modify interventions as needed. The TCP comprises of national, regional or inter-regional technical cooperation projects that are implemented for 2 to 4 years by one or more institutes in a country or various countries in a region.

As sources of technical co-operation, in kind contributions towards manpower development via training, fellowships, expert missions or scientific visits and equipment are provided to recipient Member States. Existing facilities relevant to the achievement of funded projects' objectives are supplemented with an end of sustaining the capabilities of Member States after project completion.

IAEA-supported nutrition studies in Latin America

Participation of the Latin America countries in the regular budget programme (CRPs)

Since early 1980's, Latin America countries have been involved actively in almost all IAEA's CRPs (Table 4). These have included studies on trace elements, amino acid and protein metabolism, osteoporosis, vitamin A, growth monitoring, osteoporosis and *H. Pylori* infection. Brazil, Jamaica, Mexico, Uruguay, Chile, Guatemala, Peru, Argentina and Venezuela have been among the participating countries.

The main outcomes of these CRPs and of the Latin America projects are described in the Nutrition and Health Related Environmental Studies (NAHRES) reports as indicated in (Table 5). In the last 20 years the total amount of the Agency' support to CRPs is about US\$ 2.6 million, of which US\$600,000 has been allocated to researches in Latin America countries.

Participation of Latin America countries in the Technical Cooperation Programme (TCP)

In the late 90s, the IAEA began its involvement in the evaluation of nutritional intervention programmes through the application of stable isotopes, primarily through initiatives of Member States with the support for national Technical Co-operation projects. By the decades end, Peru and Chile implemented and completed national TC Project in 1994 and 1997, respectively (Table 6).

TABLE 4.
CRP list of IAEA Nutrition Studies during 1983 – 2004

Co-ordinated Research Projects (CRP) Completed:	Project No:	Country	Starting Year
Dietary intake of trace elements	E4.30.01	Turkey, Spain, Brazil, Iraq, Sudan, Thailand, China, Italy, Sweden, USA, Canada, Yugoslavia, Australia, Finland	1983
Toxic elements in foodstuffs (RCA)	E4.30.02	Jamaica, Bangladesh, Thailand, Pakistan, Australia, China, Malaysia, India, Japan, Indonesia, Netherlands	1985
Applications of stable isotope tracers	E4.30.03	China, Germany, Ghana, Papua New Guinea, Romania, Australia, India, Malaysia, Mexico, Uruguay, Guatemala, Italy, Senegal, Nigeria, UK, US	1988
Bioavailability of Fe & Zn	E4.30.04	Chile, India, Myanmar, Pakistan, Peru, Philippines, Poland, Sri Lanka, Venezuela, UK, US	1990
Amino Acids, Protein & Energy Metabolism	E4.30.05	Bangladesh, Bolivia, Guatemala, India, Pakistan, Philippines, Jamaica, Peru	1992
Osteoporosis	E4.30.06	Brazil, Canada, Chile, China, Croatia, Hungary, Philippines, Russia, Singapore, S. Africa, Turkey	1994
Vitamin A Reference Asian Man	E4.30.07 E4.30.08	China, India, Israel, Peru, Philippines, S. Africa, Thailand Bangladesh, China, India, Indonesia, Japan, Korea, Malaysia, Pakistan, Philippines, Vietnam	1995 1995
Prevention of Stunting	E4.30.09	Argentina, Brazil, Chile, Mexico, Pakistan, Peru, Venezuela	1996
Infant Growth Monitoring (Collaboration with WHO)	E4.30.10	Bangladesh, Brazil, Chile, Pakistan, UK, USA	1999
Prevention of Degenerative Diseases (Obesity, Non-insulin Dependent Diabetes and Coronary Heart Disease) in Ageing	E4.30.11	Brazil, Chile, China, Cuba, India, Jamaica, Mexico, Nigeria	1999
Active:			
H. Pylori Infection Prevalence in Early Childhood	E4.30.12	Argentina, Bangladesh, Belgium, Benin, Chile, India, Indonesia, Mexico, Pakistan, Senegal	1999
Nutrition-Pollution Interactions and their Impact	E4.30.14	Bangladesh, Brazil, Chile, China, India, Kenya, Korea, Morocco, Peru, Sweden, Vietnam	2001
Application of isotopic and nuclear techniques to (IUGR) intrauterine growth restriction in developing countries	E4.30.15	Bangladesh, Brazil, Cameroon, India, Morocco, Pakistan, South Africa, Sudan, USA,	2003
Assessment of total energy expenditure and body composition for older adult subjects with different lifestyles	E4.30.16	Brazil, China, Guatemala, India, Mexico, Morocco, New Zealand, Philippines, South Africa, Senegal, USA	2004
Thematic Co-ordinated Research Projects (T-CRPs) for capacity development in Developing Countries			
Micronutrient Status and Interaction	E4.30.13	Bangladesh, Brazil, Ghana, India, Indonesia, Mexico, Pakistan, Sri Lanka, Thailand	2001

TABLE 5
List of NAHRES Reports from the CRP Projects during
1983-2004
(These reports are available upon request, free of cost)

CRP	NAHRES Report No.
Dietary intake of trace elements	2, 8, 10
Toxic elements in foodstuffs	3, 23
Applications of stable isotope tracers	4, 5, 7
Bioavailability of Fe & Zn	11, 20, 34
Amino Acids, Protein & Energy Metabolism	15, 21, 30, 41
Osteoporosis	14, 28, 31, 39, 40, 51, 67
Vitamin A	25, 32
Reference Asian Man	38, 54
Prevention of Stunting	44, 48
Infant Growth Monitoring	55, 79
Prevention of Degenerative Diseases	47, 70, 76
<i>H. Pylori</i> Infection Prevalence in Early Childhood	56, 78
Nutrition-Pollution Interactions	71, 80
Micronutrient Status and Interaction	72
Intrauterine growth restriction (IUGR)	73, 81
Total energy expenditure and body composition for older adult subjects with different lifestyles	74

The IAEA recognized the value of regional co-operation in facilitating transfer of know-how and capabilities, as well as integration of valuable results that provide regional if not global perspectives in dealing with common issues related to nutrition in some Latin America countries. Subsequently, some Latin American countries have become more involved in regional TC projects (Table 7). Through this realisation, a three-year regional Technical Co-operation project was initiated in 1999 on "Using Isotopes to Evaluate Nutrition Intervention Programmes (RLA/7/008)". This initially involved Argentina, Chile, Cuba, Brazil and Mexico but was completed in the latter four countries.

The regional nutrition project supported the evaluation of the effectiveness of some large nutrition supplementation programmes in place by the Latin America governments. These programs amounted US\$ 300 million in Chile, US \$ 2 billion per year in Mexico, US \$ 56 million in Brazil and US\$ 80 million per year in Cuba. These programs benefit millions of children and adults in those countries. The IAEA funded the application of isotopes activities through the Technical Co-operation Hard Core fund that subsequently was complemented by the U.S. extra-budgetary fund.

TABLE 6
List of IAEA supported National TC Projects on Nutrition
Studies during 1994-2003

National Projects Completed:	Project No.	Country	Starting year
Isotopes in nutrition studies	CHI/7/007	Chile	1997
Micromineral interaction in vulnerable groups	CHI/7/008	Chile	1999
Evaluating supplementary infant feeding practices	ETH/7/004	Ethiopia	1999
Improve child nutrition	PER/7/003	Peru	1994
Dietary studies in Portugal	POR/7/002	Portugal	1994
Isotope evaluation of community nutrition program	SEN/7/002	Senegal	1999
Evaluation of community programme	SEN/7/003	Senegal	2003
Investigating micronutrient deficiency	SIL/7/002	Sierra Leone	1995
Improvement of nutrition & diagnosis	SRL/7/004	Sri Lanka	2001
Active: Evaluating Zn, Vitamin A as supplements in treatment of Malaria	BKF/7/002	Burkina Fasso	2003
Evaluate impact of multinutrient supplements on pregnancy outcomes	EGY/7/003	Egypt	2003
Breast Milk Trace element composition and Infant Growth	GHA/6/011	Ghana	1999
Evaluation of Complementary Feeding Program	GHA/7/003	Ghana	2003
Improving nutritional status of children and women	MAG/7/003	Madagascar	2003
Trace element methods for studies workplace monitoring	NIR/7/003	Nigeria	1999
Monitoring food fortification program	SAF/7/003	South Africa	2003
Food Supplementation strategy for women in rural areas	SEN/7/004	Senegal	2003
Monitoring food fortification program in Morocco	MOR7002	Morocco	2003

Implementation strategies

Investigations and measurements in the TC projects were carried-out on specific study areas. In keeping with the principle of Technical Cooperation in Developing Countries (TCDC) that recognizes diverse capabilities within regions, measurements of isotopes were made when possible in one of the participating institutes, e.g. in Chile when need laboratory capabilities are not available in another participating country. Each participating institute is expected to provide scientific, service or data to the other project participants. A Principal Co-coordinating Counterpart with expertise that is recognized globally provides advisory

assistance that ensures adequate co-ordination of national and regional activities, and the integration of results in respective national plans and policy-making efforts. Scientific guidance provided through the implementation of national activities ensures moving towards the attainment of the objectives of regional initiatives.

TABLE 7
List of IAEA supported Regional TC Projects on Nutrition Studies during 1994-2003

Regional Projects Completed:	Project No:	Country	Starting Yr.
Measuring the Effectiveness of Multinutrient Supplementation	RAS/7/010	China, Indonesia, Malaysia, Pakistan, Philippines, Thailand, Vietnam	1999
Active: Evaluate Nutrition Intervention Programs	RLA/7/008	Chile, Cuba, Brazil, Mexico	2000
Early Diagnosis of <i>Helicobacter pylori</i> Infection (ARCALLIV)	RLA/6/042	Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Mexico, Panama, Peru, Venezuela	2001
Diagnosing Osteoporosis (RCA)	RAS/7/012	India, China (Hong Kong), Singapore, Thailand, Viet Nam, Philippine	2003
Monitoring Food fortification Program	RAS/7/014	China, Indonesia, Pakistan Thailand, Vietnam	2003
Assess nutrition intervention related to HIV/AIDS in Africa	RAF/7/006	Ghana, Senegal, South Africa,	2003

The TC regional projects in Latin America likewise have supported the regional co-ordination of activities that result in the exchange of scientific results and assess progress and future directions. Transfer of know-how has been facilitated through workshops and training courses conducted for young scientists from each participating country.

Main outcomes from the regional project on nutrition in Latin America RLA/7/008

Prior to the regional project on nutrition (RLA/7/008), worldwide data on energy expenditures were based on surveys in developed countries. No data existed from Latin America to provide a scientific basis to formulate food programmes suited to local conditions. A comparison of recently obtained project data indicates that existing references values overestimate energy needs of children below 7 years old (14).

Results from the Cuban study designed to evaluate the Cuban nutrition program's capacity to cover the energy requirements of children were obtained by applying the doubly labeled water technique. This study concluded that the energy requirement of well-nourished children is 8.6% lower than the 1985 FAO/WHO/UNU recommendations.

Through the initiatives under the regional project, Chile carried out a national effort to investigate energy balance, physical activity pattern, dietary intake and body composition in preschool children. As a result, the Chilean government recognized the necessity to reduce the energy intake of children to prevent obesity, an increasing problem in countries considered to be in "nutrition transition" (15). Scientific papers were published and presented during the International Congress on Nutrition (16).

In addition, other specific results also had other significant impacts on national programmes. Policies related to food fortified with iron and zinc in pre-school food programmes of the National Supplementary Feeding Programme (coverage of ~1.3 million) of Chile were modified based on this projects scientific results. As a result, anemia has been reduced from 28.8% to less than 8% within a year in a sample of 300 children after the program increase its foods fortified with use of iron and zinc. This generates impact on the enhancement of educational performance and decrease infections among children.

In Mexico the Social Security System in recognition of the importance of isotopic studies to their nutrition programme purchased two mass spectrometers to sustain the assessment of the effect of food supplementation to pregnant and lactating mothers and to monitor the effect of iron and zinc fortification.

In Brazil, US \$40,000 equivalent was allocated by the government for the first large-scale epidemiological study employing isotopes to measure the body composition of 200 under-nourished children after 6 months of participation in a specific intervention.

The results of investigations of energy expenditure of young children in Cuba and Chile based on doubly labeled water (14,15) were used for the first time by the FAO/WHO/UNU expert committee convened in 2001 to establish new energy recommendations. The IAEA has the opportunity to partner with other UN agencies in promoting isotope based research relevant to energy and protein requirements, mainly in developing countries.

Financial resources in support of NAHRES nutritional projects

In the last 20 years, the IAEA invested about US \$2.6 million for research activities through CRPs. Over 20% of the financing was allocated for Latin American countries. In the ten-year period, regional and national TC projects

amounted to over US\$ 7.6 million, more than double of what was invested in research in the previous 20 years. About 40% of this total amount was invested in TC projects supporting the use of isotopic techniques in nutrition research programmes in Latin American countries, and enhancing capabilities and laboratory facilities relevant to those studies. It is notable that Latin American countries are more active in TC projects than in work through the CRPs. This reflects the region's interest in applications of techniques that can yield information relevant to existing socio-development programmes.

CONCLUSION

Since the 90s Latin America countries have developed and planned designed to meet nutritional priorities in each country. However, the rate of progress of nutrition programs effectiveness remains slow in many Latin America countries. To reach millennium goals, countries must build cost effective by strategies using accurate tools for evaluation and monitoring.

It is clear that through their participation to the IAEA program in nutrition, Latin America countries have recognized the significance of nuclear and stable isotopic techniques to help secure accurate assessments of nutritional status of population and the effectiveness nutrition interventions in improving health. Indeed, some countries such as Chile, Mexico and Cuba focused nutrition intervention programmes according to local population needs that were informed by results enabled by isotopic investigations.

Although Latin America countries are represented in all the IAEA nutrition activities (CRPs and TC projects), some countries in the region have yet to incorporate isotopic techniques in tackling nutritional issues.

In addition, good technical capabilities and scientific infrastructures are now available in some countries in the region *e.g.* Chile and Mexico. These can be used as regional expertise centers and serve to build capacities in the region.

REFERENCES

1. UNICEF. The state of the world's children report. 2003.
2. The World Health Report. Geneva: World Health Organization. 2002.
3. The Bellagio Declaration. 2001. Conference on the nutrition transition and its implications for health in the developing world, Bellagio, Italia. August de 2001. Public Health Nutrition, 2001;5(1A):279-280.
4. Valencia ME, Iyengar V. Isotopic tools for strengthening health and nutritional monitoring and their current applications in developing regions of the world. Food and Nutr Bull, 2002;23 (3), 150.
5. B Miranda-da-Cruz, N Mokhtar, GV Iyengar. Stable isotopes used in nutrition research: some aspects of safety considerations. Trace Elements in Medicine 2003;4: 341-347.
6. Viteri FE, Warren R. Considerations on the use of radioisotopes in human nutrition research. Food Nutr Bull. 2002;Sep;23(3 Suppl):7-16 .
7. Bodamer OA, Halliday D. Uses of stable isotopes in clinical diagnosis and research in the paediatric population. Arch Dis Child. 2001;May;84(5):444-448.
8. Knox TA, Zafonte-Sanders M, Fields-Gardner C, Moen K, Johansen D, Paton N. Assessment of nutritional status, body composition, and human immunodeficiency virus-associated morphologic changes. Clin Infect Dis. Apr 2003;1:36(Suppl 2):S63-S68 .
9. Butte NF, Garza C, Smith EO, Nichols BL. Evaluation of deuterium dilution technique against the test-weighing procedure for the determination of breast-milk intake. Am J Clin Nutr. 1983; 37: 996-2003.
10. Walczyk T. The potential of inorganic mass spectrometry in mineral and trace element nutrition research. Fresenius J Anal Chem. 2001;Jul;370(5):444-453.
11. Gorbunov AV, Frontasyeva MV, Kistanov AA, Lyapunov SM, Okina OI, Ramadan AB. Heavy and toxic metals in staple foodstuffs and agriproducts from contaminated soils. J Environ Sci Health B. 203;Mar;38(2):181-192.
12. Thomas E, Richardson JC, Irvine A, Hassell AB, Hay EM. Osteoporosis: what are the implications of DEXA scanning 'high risk' women in primary care? Fam Pract. 2003;Jun;20(3):289-293.
13. Ghooos Y, Geypens B, Rutgeerts P. Stable isotopes and ¹³CO₂ breath tests for investigating gastrointestinal functions. Food and Nutr Bull, 2002;23 (3), 76.
14. Hernandez- Triana M, Salazar G, Diaz E, Sanchez V, Basabe B, Gonzalez S, Diaz ME. Total Energy Expenditure by the doubly-labeled water method in rural preschool children in Cuba. Food and Nutr Bull. 2002;23 (3), 76-.
15. Velasquez MM, Salazar G, Vio F, Hernandez J., Rojas J. Nutritional status and body composition in Chilean preschool children attending day care centers. Food Nutr Bull. 2002;23 (3), 250.
16. Book of Abstracts. 17th International Congress of Nutrition, August 27-31, 2001. Annals of Nutrition and Metabolism. Vienna, Austria, 2001;347-366.

Recibido: 21-08-2003

Aceptado: 09-03-2004

La pica durante el embarazo: un trastorno frecuentemente subestimado

Laura Beatriz López, Carlos Rafael Ortega Soler, María Luz Pita Martín de Portela

Escuela de Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires - Servicio de Obstetricia y Gineología.
Hospital Dr. D. Paroissien. La Matanza. Pcia de Buenos Aires, - Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia
y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

RESUMEN. La pica se manifiesta por la ingesta persistente y compulsiva de sustancias no nutritivas como tierra, arcilla, tiza, jabón y hielo. Las formas más comunes son la geofagia o consumo de tierra y la pagofagia o consumo de hielo. La descripción de este peculiar fenómeno se remonta a la época de la civilización greco-romana. Su presencia durante el embarazo es generalmente poco estudiada o subestimada, los datos publicados indican que puede manifestarse con una prevalencia que varía del 8% al 65%. Las cifras provenientes de investigaciones en América Latina refieren una prevalencia del 23% al 44%. No está claro aún cuáles son las causas que predisponen a este trastorno, sin embargo es frecuente su presencia en gestantes que presentan anemia o un estado nutricional deficiente con respecto al hierro. Su diagnóstico, que sólo consiste en interrogar sobre esta práctica a las gestantes, es frecuentemente ignorado durante la atención prenatal, probablemente debido al desconocimiento por parte del equipo de salud respecto a este trastorno. La identificación de la práctica de pica durante el embarazo contribuirá a detectar un grupo de gestantes con riesgo nutricional, en quienes sea necesario implementar estrategias tanto de evaluación como de educación nutricional.
Palabras clave: Pica, geofagia, pagofagia, anemia y embarazo.

SUMMARY. **Pica during pregnancy: a frequently underestimated problem.** Pica is the compulsive intake of non-nutritive substances such as earth, clay, chalk, soap and ice. The most common forms of pica are geophagia or the intake of earth and pagophagia or the intake of ice. The description of this peculiar phenomenon dates back to the Greco-Roman civilization. Its prevalence during pregnancy is generally underestimated. Published data reveal a prevalence of between 8% and 65%. Investigations from Latin America indicate a prevalence of 23% to 44%. It is not clear yet which are the causes that predispose to pica, but they are frequently associated with anemia or iron deficiency during pregnancy. Its diagnosis, which only consists in questioning pregnant women, is generally omitted during prenatal care, probably because health professionals have no knowledge about this disorder. The identification of pica in pregnant women could contribute to the detection of a risk group where it is necessary to implement strategies as regards both the evaluation and the nutritional education.

Key words: Pica, geophagia, pagophagia, anemia and pregnancy.

INTRODUCCION

La pica es un desorden en el apetito, que se manifiesta por la ingesta compulsiva y persistente de sustancias generalmente no alimentarias o con muy poco valor nutritivo. El término pica proviene del vocablo latino para denominar a la *urraca* o *magpie*, ave perteneciente a la familia del cuervo, cuyo nombre científico es *pica pica*. La urraca es conocida por su apetito voraz, y por comer o “*tratar de comer*” un amplio rango de sustancias, incluyendo también varias que no son alimentos (1).

Según el Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina de Dorland, se define a la pica como: “Acción de comer compulsivamente sustancias no nutritivas como por ejemplo hielo, tierra, grava, pintura, yeso, arcilla, pelo, almidón de lavandería.” En el Diccionario Mosby de Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud se agrega: “Este trastorno

del apetito puede producirse en algunos déficits nutricionales, en el embarazo y en algunas formas de salud mental” (2,3).

Varios términos han sido empleados a lo largo de la historia para referirse a esta práctica, incluyendo: picacia, pellacia, pseudorexía, geomanía, hapsicoria, todos referidos con diferentes grados de especificidad al apetito descontrolado por sustancias no comestibles. Aunque en forma estricta la pica se refiere a la ingesta compulsiva de sustancias no nutritivas, también es posible observar el consumo obsesivo de cantidades inusualmente elevadas de alimentos, y este trastorno se ha denominado “pica para alimentos” o “malacia” o “citta”, y varios autores lo incluyen en la categoría de pica (4).

Sin embargo, la definición de pica debe interpretarse en el contexto de las pautas culturales de la población, en virtud de las diferentes y posibles definiciones de lo que es considerado alimento. En la cuarta edición del *Diagnosis*

and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) se excluyó a la pica de la categoría de trastornos de la conducta alimentaria (5).

Una característica uniforme en quienes presentan este trastorno es que a diferencia de la urraca, que no tiene selectividad en los objetos que incorpora, el consumo de sustancias no nutritivas en el hombre responde a una selección especial para un determinado elemento y esta preferencia compulsiva se mantiene hasta que se revierte el desorden.

Esta perversión del apetito no es un problema reciente; la ingesta de sustancias no comestibles se remonta a la época de la civilización griega. En el año 40 antes de Cristo ya se documentaba el uso de arcilla para curar enfermedades o tratar el envenenamiento y se registran varios casos de este peculiar deseo de ingerir sustancias no comestibles. En su reciente revisión sobre el tema, Woywodt señala que es Hipócrates a quien se le atribuye la primera descripción de pica, y menciona un párrafo extraído de sus obras: "Si una mujer embarazada siente el deseo de comer tierra y la consume, el niño mostrará iguales signos". De estas observaciones puede inferirse que tanto los griegos como los romanos estaban familiarizados con este trastorno. En un famoso libro romano de medicina, escrito por Cornelius Celsus durante el reinado del Emperador Tiberius, se advierte acerca de los potenciales efectos adversos asociados al consumo excesivo de sustancias no nutritivas (6,7).

En el Siglo VI se vislumbra más claramente la asociación entre el hábito de pica y la gestación, y es Aetius, médico de la Corte del Emperador Justiniano I de Constantinopla, quien presenta la primera descripción de pica durante el embarazo explicando que a partir del segundo mes de gestación puede presentarse un trastorno en el que la mujer siente deseos de consumir diferentes objetos como tierra, cáscaras de huevo o cenizas.

Avicena, en el Siglo X, observa que la pica se corrige mediante el consumo del "hierro contenido en el vino fino". Debido a que en la Europa medieval la práctica de la obstetricia y la ginecología era llevada a cabo en gran parte por las parteras, existen pocos documentos disponibles, con la excepción del libro de Trotula, una partera que en el siglo XI, en Salerno, detalla que si durante el embarazo la mujer consume tierra o tiza debe indicársele que ingiera legumbres cocidas con azúcar. (8).

En los documentos de los Siglos XVI y XVII la pica se menciona frecuentemente como un síntoma asociado a otra patología muy frecuente en aquella época en Europa: la clorosis. Esta enfermedad afectaba principalmente a las mujeres en la pubertad. Sus síntomas característicos eran irregularidades menstruales, palidez, coloración amarillo-verdosa de la piel, pérdida del apetito, pérdida de peso y una marcada pica para sustancias no nutritivas.

La primera descripción detallada y exhaustiva acerca de

la pica tanto en las mujeres jóvenes como en las embarazadas, se menciona en el libro de Jean Liebaux, publicado en Francia en 1582, obra que trataba acerca de las enfermedades que afectaban a las mujeres. En esa época aparecen además varias Tesis Doctorales que tratan sobre el tema, entre estos autores se destacan los aportes de Boetius -quien resalta el tratamiento con hierro como terapéutica, y Ledelius quien insiste en que es muy importante determinar la causa básica de la pica para poder conocer más acerca de esta enfermedad (8).

El trastorno continúa siendo común en las mujeres con clorosis en Europa durante los Siglos XVIII y XIX, y se suman en ese período los aportes de los exploradores, antropólogos y médicos de las colonias. Uno de estos autores fue Alexander von Humboldt, explorador alemán quien describió la pica para el consumo de tierra en tribus de Sudamérica. Humboldt observó que los Otomacs, indígenas que habitaban a orillas del río Orinoco, en Venezuela, apilaban tierra y la guardaban como reserva para ser consumida en períodos de hambruna. El trastorno afectaba también a los esclavos que trabajaban en las plantaciones y preocupaba a los terratenientes, quienes observaban que aquellos trabajadores que consumían tierra se debilitaban progresivamente, tenían menos capacidad de trabajo y eventualmente morían. Por tal motivo llegaron al punto de diseñar máscaras que les obligaban a usar con el fin de evitar el consumo de tierra.

Sustancias consumidas

Las sustancias que no son alimentos y se consumen con mayor frecuencia durante la pica son tierra o arcilla y almidón de lavandería. Sin embargo, pueden ser ingeridos una variedad muy caprichosa de artículos alimenticios o no, como papel, fósforos quemados, pelo, piedras, arena, carbón, hollín, ceniza de cigarrillo, bolas de naftalina, tabletas de antiácidos, leche de magnesio, bicarbonato de sodio, pasta de dientes, papas crudas congeladas, jabón, tiza, etcétera (9-13).

Entre 1968 y 1969, Reynolds y Coltman investigaron la relación entre el consumo de extraordinarias cantidades de hielo en pacientes con diagnóstico de anemia en dos Bases Aéreas de los Estados Unidos. Posteriormente, en 1984, Haubrich define este trastorno como una de las formas de pica y lo incluye dentro de la clasificación de la misma (14-18).

La denominación para varias formas específicas de pica se construye a partir del vocablo griego de la sustancia consumida seguido del sufijo *fagia* que deriva también del vocablo griego *phagein* y significa "comer". De esta manera las denominaciones habituales de la pica para la tierra son geofagia, y para el hielo pagofagia. Con la denominación "polipica" se entiende al consumo de más de una sustancia no nutritiva durante el mismo período (4).

En la actualidad se considera que puede existir una variación en las sustancias que son consumidas en función de cambios generacionales que responden a modificaciones en la disponibilidad de sustancias de acuerdo al medio ambiente y a procesos tecnológicos. De esta manera, el consumo de arroz crudo o papas fritas congeladas pueden considerarse como formas más *sofisticadas* y actuales de amilofagia en sustitución del consumo de almidón de lavandería (8).

Las sustancias ingeridas que en la literatura se han identificado durante la práctica de pica se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1
Sustancias consumidas durante el hábito de Pica referidas en la bibliografía

Forma de PICA	Sustancia consumida	Referencias
Amilofagia	Almidón de lavandería	19-22
Cautopierofagia	Fósforos	6
Coniofagia	Polvillo	6,11
Geomelofagia	Papas crudas congeladas	23,24
Geofagia	Tierra o arcilla	1-9,25-44
Gooberfagia	Maní *	4,45
Lectofagia	Lechuga*	4,46
Litofagia	Piedras, reboque	4,6
Pagofagia	Hielo	14-18
Stachofagia	Cenizas de cigarrillo	4,25,47
Tricofagia	Pelo	4,6
Xylofagia	Escarbadienes	4,11
Formas sin denominación	Chocolate*, Helado*, Frutas*, Pickles*, Sal*	4,6,30,46
	Desinfectante	4,11
	Goma, granos de café, lana	4
	Harina*	4,11
	Jabón	4
	Polvo de homear	4,11,32,49
	Papel	4,6,48
	Plástico	4,50
	Pasta dental	4
	Tabletas de naftalina	4
	Tiza	4,9,51

* En cantidades aberrantes

Etiología

No se ha dilucidado aún la etiología de la pica, aunque es frecuente su asociación a estados de malnutrición. Desde que fuera inicialmente descripta se le atribuye a la geofagia un efecto de saciedad, que se utiliza paliativamente en períodos de hambruna. Algunas explicaciones con respecto a los factores fisiológicos que predispondrían a la pica podrían extrapolarse de estudios y observaciones en animales. Se ha descrito que en las ratas la pica es un comportamiento similar al vómito en otras especies, como una respuesta para mitigar los efectos de agentes tóxicos. Aparentemente, en las ratas

la geofagia aumenta con la mayor severidad de la enfermedad. En estos animales, la pica puede convertirse en una práctica adquirida como respuesta a un estado patológico y puede persistir luego de revertirse el mismo, como una respuesta aprendida en períodos de estrés fisiológico. Existen también ejemplos de cómo los animales intentan mantener la homeostasis del organismo consumiendo elementos muy ricos en sodio, fósforo o calcio cuando estos nutrientes no están disponibles naturalmente en sus dietas. Se ha sugerido entonces que la deficiencia de calcio o hierro predisponen al consumo de sustancias que los contengan en un intento inconsciente de incorporar los nutrientes carentes en el organismo. Sin embargo, no existen evidencias de que en el ser humano la pica responda a un "apetito compensatorio", y tampoco se ha demostrado que exista una correlación entre la sustancia consumida durante la pica y una deficiencia nutricional específica (7,42).

No obstante, se ha observado que existe una fuerte y persistente asociación entre este trastorno y la falta de hierro en el organismo, pero aún se ignora cuál es la relación exacta entre estos dos factores. Algunos autores piensan que la anemia es un resultado de la pica, otros creen que es la causa.

Los investigadores que apoyan la teoría de que la pica es una causa de anemia se basan en que la ingesta de sustancias como tierra o arcilla inhibirían la absorción del hierro dietético. Se observó que la arcilla posee una gran capacidad de intercambio de cationes, formando con el hierro compuestos insolubles. La anemia se ha atribuido también al reemplazo de los alimentos por sustancias que los sustituyen dando valor de saciedad aunque sin aporte energético ni de micronutrientes (51-52).

Sin embargo, en la actualidad son cada vez más los estudios que sugieren que la depleción de las reservas de hierro es el origen de la pica, y este trastorno es reconocido como uno de los signos característicos de la anemia ferropénica. Se ha demostrado además que la suplementación con hierro disminuye o suspende el hábito de pica (15,17,23).

Edwards y colaboradores hallaron diferencias significativas en los valores de ferritina sérica entre las embarazadas con o sin pica, siendo inferior en las primeras. En una investigación reciente, Rainville observó cifras de hemoglobina estadísticamente inferiores en las gestantes con pica en comparación con embarazadas sin el trastorno. En Argentina, hemos observado también que las gestantes con pica, comparadas con un grupo de gestantes de similares características socioeconómicas pero sin el trastorno, presentaron un mayor riesgo de deficiencia de hierro (22,37,38).

Otra teoría sugiere que la deficiencia de nutrientes como el hierro o el zinc serían los responsables de alteraciones en el funcionamiento de las enzimas reguladoras del apetito. En 1972, Wallace Brown presentó dos hipótesis en un intento

de explicar el hábito de pagofagia observado en adolescentes anémicas. Este investigador observó que la ingesta de hielo cesa mediante la suplementación con hierro antes de que la anemia sea corregida; por lo tanto, sugiere que podría existir alguna relación en la actividad de enzimas que contienen hierro como la citocromo-oxidasa, que se localiza en la mucosa bucal y que se encuentra disminuida en la depleción del mineral. Por otro lado, propuso que las alteraciones en el apetito podrían responder a una disminución de otras enzimas hierro-dependientes a nivel del sistema nervioso central. La misma hipótesis fue mencionada por Sayeta en su revisión sobre los distintos aspectos causales de la pica (17,26).

Se ha postulado también que, durante el embarazo, la geofagia podría asociarse a un alivio en las náuseas, debido a que condiciona un aumento en la salivación y una alteración en el gusto y el olfato (26,54).

Los factores culturales y aquellos relacionados con la tradición constituyen otro condicionante que debe ser tenido en cuenta al interpretar las causas que predisponen al consumo de sustancias no nutritivas. Estudios realizados en Alabama, Estados Unidos, en 1995, en mujeres embarazadas y no embarazadas que tenían el hábito de comer arcilla, maicena, harina y bicarbonato de sodio, revelaron que la mayor parte de las mujeres creían que tales sustancias “evitan el vómito, suprimen los vértigos, curan la hinchazón de las piernas y aseguran el nacimiento de niños hermosos”. Investigaciones anteriores, llevadas a cabo por O’Rourke en Augusta, Estados Unidos, en 1967, revelan que para las mujeres embarazadas que manifestaron la práctica de geofagia, la arcilla blanca y fina era un manjar exquisito. Los granjeros de Georgia vendían en los mercados urbanos arcilla en cajas de zapatos o las remitían por correo. También se comerciaban otras sustancias relacionadas con la pica: leche de magnesia en polvo y parafina, y los familiares que visitaban a las mujeres gestantes les obsequiaban arcilla. Esta modalidad de comercialización de las sustancias ingeridas durante la pica es también comentada por Antelman -quien hace referencia a la venta de arcilla especialmente destinada al consumo humano en varias aldeas de Tanzania- y, por Halsted -quien describe, en Guatemala, la venta de arcilla en cajas especiales con el dibujo de una catedral, especialmente destinadas a mujeres embarazadas- (11,44-55).

Geissler evaluó en un enfoque antropológico las motivaciones que conducían a la geofagia en mujeres africanas que presentaron el trastorno. Las mismas describieron esta práctica como un hábito predominantemente femenino y que se relacionaba con la fertilidad, la reproducción, y también con la parasitosis, la “debilidad” y la “falta de sangre”. En esa comunidad, la geofagia forma parte de las pautas culturales y es aceptada como una manifestación de la femineidad (56).

La geofagia es también frecuente entre las comunidades indígenas de todos los continentes. Debido a su elevada dependencia de la tierra y contacto con ésta, los indígenas se encuentran frecuentemente en riesgo de consumirla en forma inadvertida. Según las observaciones de Anell, citadas por Simon, la geofagia en las comunidades indígenas podría clasificarse en cuatro categorías: atribuyéndole propiedades curativas, como un condimento, como sustituto de alimentos en períodos de escasez, o bien formando parte de actos rituales. Entre las propiedades curativas que las sociedades primitivas le han atribuido a la tierra se encuentran su utilización para tratar episodios de diarrea, prevenir el envenenamiento por pescados, o tratar infecciones parasitarias (42).

Factores de orden psíquico podrían también influir en la presencia de pica, y se ha postulado que tales perversiones del apetito representan un intento inconsciente de compensar carencias; de esta manera el consumo de tierra o almidón satisfarían ciertas necesidades individuales como el hambre o una aspiración social. Sin embargo, son muy pocos los estudios que evaluaron los aspectos psicosociales de la pica. Boyle sugiere que el aumento del estrés de la madre podría estar relacionado con esta problemática y menciona que, para varias mujeres, el no poder consumir la sustancia deseada les ocasiona ansiedad, preocupación o enojo. Edwards también postula que podría existir una relación entre el estrés materno y la práctica de pica durante la gestación, manifestando que las mujeres que refieren el trastorno durante la segunda mitad del embarazo podrían haber estado expuestas a situaciones de estrés en el comienzo de la gestación y la práctica de pica las ayudaba a aplacar esa situación. Aunque no se tienen informes específicos de gestantes, se ha observado en niños que presentan pica un mayor nivel de factores de estrés psicosocial comparativamente con niños sin el trastorno (6,22,57).

Prevalencia

Existe poca información en la bibliografía referente a la frecuencia de este trastorno alimentario en el embarazo y sus consecuencias para la salud materno-fetal. En la Tabla 2 se resumen los datos publicados en los últimos años con respecto a la presencia de pica durante la gestación en distintos lugares del mundo. La mayor parte de la información proviene de los Estados Unidos, de las regiones de California, donde las formas más características de pica son la pagofagia y la amilofagia. En Africa se registran altas cifras de prevalencia, afectando del 50% al 70% de las embarazadas estudiadas en Kenia.

TABLA 2
Estudios que evaluaron la prevalencia de pica durante el embarazo

Región y año (N° de casos)	Sustancias	Prevalencia consumidas	Autor (referencia)
Estados Unidos,1967 (n= 200)	Arcilla	55%	O'Rourke DE (44)
Estados Unidos,1968 (n= 987)	Almidón	35%	Keith L (19)
Estados Unidos,1979 (n= 142)	Tierra, almidón, polvo de hornear	28%	Vermeer D (43)
Estados Unidos,1994 (n= 553)	Tierra, hielo, almidón, polvo de hornear, arcilla	8%	Edwards C (22)
Arabia Saudita,1995 (n= 321)	Tierra	9%	Al-Kanhal-MA (35)
Estados Unidos,1995 (n=125)	Tierra, hielo, jabón, cenizas, tizas, fósforos quemados	14%	Smulian JC (28)
Estados Unidos,1995 (n= 300)	Hielo, polvo de hornear, tierra, jabón	65%	Cooksey N (11)
Kenia,1998 (n= 52)	Tierra	56%	Geissler PW (59)
Estados Unidos,1998 (n= 281)	Tierra, hielo, polvo de hornear, harina, almidón.	8%	Rainville,A (37)
México, 2000 (n=75)	Hielo, arcilla, carbonato de magnesio	44%	Simpson E (39)
Argentina,2000 (n= 300)	Tierra, hielo tiza, jabón, yerba	22%	López LB (58)
Estados Unidos,2000 (n= 150)	Hielo, arcilla, carbonato de magnesio	31%	Simpson E (39)
Kenia, 2001 (n/d)	Sustancias no alimenticias y alimentos	50%	Sule S (29)
Venezuela,2002 (n= 200)	N/d	36.5%	Rached-Paoli,I (81)

N/d= No disponible

Los datos disponibles de mujeres en América Latina provienen de las investigaciones de Simpson, quien registró en una muestra de 75 gestantes residentes en Ensenada (México) una prevalencia de pica del 44%, nuestras observaciones, que revelaron una prevalencia de geofagia y otras formas de pica del 22,6% en un grupo de 300 gestantes de la provincia de Buenos Aires (Argentina) y los aportes de Rached-Paoli, que en una muestra de 200 mujeres gestantes en Caracas (Venezuela), observó una prevalencia del 36,5% (39,58,81).

En su trabajo de revisión, Horner ha propuesto algunos factores de riesgo que predispondrían a este trastorno durante el embarazo. En el análisis de la literatura publicada durante el período 1950-1990, este autor observó que la práctica de geofagia y amilofagia durante la gestación se presenta con mayor prevalencia en mujeres de raza negra, que habitan en áreas suburbanas y que han presentado antecedentes familiares de pica. Además, la presencia de pica sería más frecuente en

mujeres mayores de 25 años, que presentan un bajo nivel socioeconómico, y un deficiente estado nutricional (30).

Consecuencias para la salud materno-fetal

Los posibles efectos adversos en los recién nacidos de madres con pica incluyen prematuridad, mortalidad perinatal, peso bajo al nacer, irritabilidad, disminución del perímetro cefálico, y exposición a contaminantes químicos como plomo, pesticidas y herbicidas (60-62).

Con respecto a las consecuencias que este trastorno ocasiona en la mujer durante la gestación, las mismas dependen de la naturaleza de la sustancia consumida y pueden incluir constipación, obstrucción intestinal, daño en las piezas dentarias, hiperkalemia, toxicidad con plomo u otras toxinas ambientales y toxoplasmosis u otras parasitosis (63-67).

Se ha documentado como complicación extrema en Carolina del Sur, Estados Unidos, un caso de muerte materna debido a una obstrucción y perforación intestinal en una

paciente con el hábito de geofagia. La gestante había referido el consumo diario de alrededor de 300 gramos de arcilla durante su embarazo que cursaba la semana 24 (68).

En gestantes con pica que consumieron polvo de hornear se ha observado hipertensión, hipokalemia y alteraciones hidroelectrolíticas, las que son corregidas luego de modificar los hábitos alimentarios (49).

Estudios recientes que han evaluado los niveles de plomo en sangre en embarazadas, revelan que el riesgo de presentar niveles elevados es notablemente superior en las gestantes que presentan el hábito de geofagia. El estudio de la toxicidad con plomo como un problema sanitario ha ganado interés en los últimos años debido a la ubicua distribución de este elemento en el medio ambiente y a las serias complicaciones que su exceso ocasiona entre las que se incluyen: anemia, daño renal, y alteraciones en el sistema nervioso central (61,64,65).

La consecuencia más habitual en las embarazadas con pica es la presencia de anemia o deficiencia de hierro. Un estado nutricional deficiente con respecto al hierro durante el embarazo se asocia a efectos adversos en el neonato, tales como mayor probabilidad de nacimientos pretérmino, peso bajo y muerte fetal. Estudios observacionales revelan además que las gestantes con deficiencia de hierro registran también un mayor riesgo de complicaciones durante el embarazo incluyendo infecciones urinarias, pielonefritis y preeclampsia. Por otro lado, en mujeres que presentan anemia en el momento del parto, la disminución de fuerza en la musculatura estriada por menor oxigenación puede prolongar el período expulsivo. No deben desestimarse las consecuencias que resultan de la fatiga, el cansancio y la apatía características de la deficiencia de hierro. Estos efectos adversos no sólo disminuyen la capacidad de trabajo en la mujer sino que dificultan el cuidado de su embarazo y de su progenie (69-72).

No existen datos publicados referentes a la relación posible que existe entre el estado nutricional respecto al zinc durante la gestación y la presencia de pica; sin embargo, se ha documentado que en niños con geofagia es frecuente un estado nutricional deficiente con respecto al zinc (73).

Teniendo en cuenta que desde la valoración nutricional, los efectos adversos que se asocian a la pica son la deficiencia de hierro y probablemente la de zinc, es que se considera importante remarcar las funciones de tales nutrientes durante la gestación, los indicadores que se utilizan para evaluar el estado nutricional de los mismos y las consecuencias de su carencia para el binomio madre-hijo.

Aunque los datos publicados son contradictorios, durante la gestación, la deficiencia de zinc predispone al nacimiento de neonatos de peso bajo. Se ha observado además que las gestantes que consumen menos de 6 mg/día de zinc presentan un mayor riesgo en la ocurrencia de partos prematuros. Varias investigaciones que evaluaron los efectos de la

suplementación con zinc durante el embarazo registraron un aumento en la edad gestacional y en el peso de los recién nacidos de madres suplementadas. Otros investigadores han relacionado la ingesta deficiente en zinc con una mayor prevalencia en el desarrollo de malformaciones neonatales. En una revisión reciente sobre los efectos del zinc en el desarrollo cognitivo se sugiere que la deficiencia de zinc durante el embarazo y la lactancia se asocia a una menor percepción, capacidad de atención y a una disminución de las funciones motoras en los infantes a los seis meses de edad (74-80).

Teniendo en cuenta que la presencia de pica durante el embarazo podría asociarse a un mayor riesgo de deficiencia de estos dos oligoelementos y considerando las posibles consecuencias que la carencia de los mismos ocasiona tanto para la salud materna como fetal, es que debería detectarse la presencia de pica en el embarazo a fin de controlar el estado nutricional en aquellas gestantes que la presenten y educarlas para lograr corregir los hábitos alimentarios.

Una correcta evaluación del estado nutricional supone la determinación de variables antropométricas, dietéticas, bioquímicas y clínicas, las que elegidas adecuadamente permiten determinar carencias y deficiencias marginales. Sin embargo, tal tipo de evaluación no es llevada a cabo en forma rutinaria en países en vías de desarrollo, debido al costo que supone tanto en recursos humanos como materiales. Si la presencia de pica se asocia a un estado nutricional deficiente, su detección sería de utilidad para llevar a cabo una evaluación nutricional más exhaustiva en aquellas embarazadas que la presenten e implementar las intervenciones nutricionales correspondientes para corregir las deficiencias. El diagnóstico de pica se lleva a cabo mediante un interrogatorio simple y directo indagando acerca del consumo de hielo o sustancias no comestibles durante el embarazo. Sin embargo, tal diagnóstico no se realiza habitualmente durante el control del embarazo, fundamentalmente debido al desconocimiento por parte del equipo de salud con respecto a esta práctica y su relación con el estado nutricional de la gestante.

Por otro lado, una opinión coincidente entre los autores que han investigado en los últimos años este trastorno es la necesidad de continuar profundizando los conocimientos, mediante investigaciones que aporten más información con respecto a la prevalencia, causalidad y efectos perjudiciales que la práctica de pica ocasiona durante la gestación (26-28,30,37-39).

AGRADECIMIENTOS

Trabajo realizado en el marco de los Proyectos UBACyT, TB 060 y B 009, financiados por la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral de la Licenciada en Nutrición Laura Beatriz López, Becaria de la Universidad de Buenos Aires, durante el período 2001-2003.

REFERENCIAS

1. Mc Loughlin I. The pica. *Br J Hosp Med.* 1987; 37: 286-292.
2. Dorland. Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. 22 Edición. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. 1992:1338.
3. Diccionario Mosby. Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud. 5ta Edición. Ediciones Harcourt España SA. Madrid. 2000: 962.
4. Moore D, Sears D. Pica, iron deficiency and the medical history. *Am J Med.* 1994; 97:390-393.
5. Sugita K. Pica: pathogenesis and therapeutic approach. *Nippon Rinsho* 2001; 59(3):561-565.
6. Boyle J Mackey M. Pica; Sorting it out. *Journal of Transcultural Nursing* 1999; 10(1): 65-68.
7. Woywodt A. Geophagia: the history of earth-eating. *J R Soc. Med.* 2002; 95:143-146.
8. Parry Jones B, Parry Jones LL. Pica: Symptom or eating disorder? A Historical Assessment. *Br J Psychiatry* 1992; 160:341-354.
9. Crosby WH. Food pica and iron deficiency. *Arch. Intern. Med.* 1971; 127:960-961.
10. Johnson B, Stephens RT. Geomelophagia: an unusual pica in iron deficiency anemia. *Am J Med.* 1982; 73:931-32.
11. Cooksey N. Pica and olfactory craving of pregnancy: how deep are the secrets? *Birth* 1995; 22:129-37.
12. Barton J, Riely C, Sibai B. Baking powder pica mimicking preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 167:98-9.
13. Luke B. Nutrición Materna. Ed. Salvat. Barcelona 1983: 57-60.
14. Coltman CA. Pagophagia. *Arch Inter Med.* 1971; 128:472-73.
15. Coltman CA. Pagophagia and iron lack. *JAMA.* 1969; 207(3): 513-516.
16. Reynolds RD, Binder HJ, Miller MB. Pagophagia and iron deficiency anemia. *Ann Intern Med.* 1968; 69:435-440.
17. Brown W, Dymont PH. Pagophagia and iron deficiency anemia in adolescent girls *Pediatrics.* 1972; 49:766-67.
18. Parry JB. Pagophagia or compulsive ice consumption: a historical perspective. *Psychol. Med.* 1992; 22(3): 561-71.
19. Keith L, Evenhouse H, Wesber A. Amylophagia during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1968; 32: 415-418.
20. Keih L, Evenhouse H, Wesber A. Pica. *Obstet Gynecol* 1968; 32: 415-18.
21. Jackson WC, Martin JP. Amylophagia presenting as gestational diabetes. *Arch Fam Med* 2000; 9(7): 649-652
22. Edwards CH, Johnson A, Knight E, Oyemade U, Cole O, Westney O, Jones S. Pica in an urban environment. *J Nutr.* 1994; 124: 954-957.
23. Johnson B, Stephens R. Geomelophagia: an unusual pica in iron deficiency anemia. *Am J Med.* 1982; 73: 931-932.
24. Libnoch JA. Geomelophagia: an unusual pica in iron deficiency anemia. *Am J Med.* 1984; 76(1): A69. Letter.
25. Federman DG, Kirsner RS, Federman GS. Pica: are you hungry for the facts?. *Conn Med.* 1997; 61(858): 207-2097.
26. Sayeta R. Pica: an overview. *Am Farm Physician* 1986; 33: 181-185.
27. Lacey E. Broadening the perspective of pica: literature review. *Public Health Rep* 1990; 105(1): 25-29.
28. Smulian JA, Motiwala S, Sigman R. Pica in rural obstetric population. *South Med J* 1995; 88: 1236-40.
29. Sule S, Madugu HN. Pica in pregnant women in Zaria, Nigeria. *Higer J Med* 2001; 10(1): 25-27.
30. Horner R, Lackey C, Kolasa K, Warren K. Pica practices of pregnant women. *J Am Diet Assoc.* 1991; 91: 34-38.
31. Walker A, Walker B, Jones J, Verardi M, Walker C. Nausea and vomiting and dietary cravings and aversions during pregnancy in South African women. *Br J Obstet Gynecol.* 1985; 92(5): 484-89.
32. Walker A, Walker B, Sookaria FI, Cannan RJ. Pica. *J R Soc. Health* 1997; 117(5): 280-284.
33. Reid RM. Cultural and medical perspectives on geophagia. *Med Antropol.* 1992; 13(4): 337-51.
34. Geissler PW, Mwaniki DL, Thiong'o F, Friis H. Geophagy among school children in western Kenya. *Trop. Med. Int. Health* 1997; 2(7): 624-630.
35. Al-Kanhal MH, Baniy J. Foods habits during pregnancy among Saudi women. *Int J Vitam. Nutr. Res* 1995; 65 : 206-10 .
36. Minnich V, Okguoglu A, Tarcon Y, Arcasoy A, Renda F, Demirag B. Pica in Turkey. *Am J Clin. Nutr.* 1968; 21: 78-86.
37. Rainville A. Pica practices of pregnant women are associated with lower maternal hemoglobin level at delivery. *J Am Diet Assoc.* 1998; 98: 293-296.
38. López LB, Langini S, Fleichman S, Portela ML, Ortega Soler C. Iron deficiency in pregnant women with pica. *J Am Diet Assoc.* 2001; 9 (Supplement 1 A-104) .
39. Simpson E, Mull Dennis Longley E, East J. Pica during pregnancy in low income women born in Mexico. *West J Med* 2000; 173: 20-24.
40. Abrahams PW. Geophagy and iron supplementation in Uganda. *Trop Med Int Health* 1997; 2(7): 609-611.
41. Mokhobo K. Iron deficiency anemia and pica. *S. Afr. Med. J* .1986 70(8): 473-75.
42. Simon S. Soil ingestion by humans: A review of history, data and etiology with application to risk assessment of radioactively contaminated soil. *Health Physics* 1998; 74(6): 647-672.
43. Vermeer D, Frate D. Geophagia in rural Mississippi: environmental and cultural contexts and nutritional implications. *Am J Clin. Nutr.* 1979; 32: 2129-2135.
44. O'Rourke D, Quinn J, Nicholson J. Geophagia during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 1967, 29: 581-584
45. O'Brien W, Arkin RM. Goodberophagia and anemia. *Ann Intern. Med.* 1969; 70:232. Letter.
46. Pope JF, Skinner JD. Cravings and aversions of pregnant adolescents. *J Am Diet Assoc.* 1992; 92(12): 1479-1482.
47. Piazza CC, Hanley GP, Fisher WM. Functional analysis and treatment of cigarette pica. *J Appl Behav Anal* 1996; 29(4): 473-49.

48. Callinan V, O'Hare JA. Cardboard chewing: cause and effect of iron deficiency anemia. *Am J Med.* 1988;85:449.
49. Barton JR, Riely C. Backing powder pica: mimicking preeclampsia. *Am J Obst Gynecol.* 1992; 167(1): 98-99.
50. Battin M, Kennedy J, Singh S. A case of plastikophagia. *Postgrad. Med. J.* 1997; 73: 243-244.
51. Grigsby R, Thyer B, Waller R, Johnston G. Chalk eating in middle Georgia: a culture-bound syndrome of pica? *South Med J.* 1999;92(2):190-192.
52. Orton CH, Rose L. The effect of starch ingestion on excessive iron absorption. *Ann Intern Med* 1968; 68:1165.
53. Talkington K, Gant N, Scott D, Pritchard J. Effect of ingestion of starch and some clays on iron absorption. *Am J Obstet Gynecol* 1970;108:262-267.
54. O'Brien B, Relyea M. Use of indigenous explanations and remedies to further understand nausea and vomiting during pregnancy. *Health Care Women Int.* 1999;20(1):49-61.
55. Antelman G, Msamanga G, Spiegelman D, Urass E, Narh R, Hunter D, Fawz W. Nutritional Factors and Infectious Disease Contribute to Anemia among Pregnant Women with Human Immunodeficiency Virus in Tanzania. *J.Nutr.* 2000;130:1950-1957.
56. Geissler PW, Prince RJ, Levene M, Poda C, Beckerleg SE, Mutemi W, Shulman CE. Perceptions of soil-eating and anemia among pregnant women on the Kenyan coast. *Soc. Sci. Med.* 1999;48(8):1069-1079.
57. Singhi S, Singhi P, Frate D. Role of psychosocial stress in the cause of pica. *Clinical Paediatrics.* 1981; 20:783-785.
58. López LB, Portela ML, Ortega Soler CR. Pica prevalence in a group of pregnant women from Buenos Aires, Argentina. *The FASEB J.* 2000. Abs. 178.14.
59. Geissler PW. Geophagy, iron status and anaemia among pregnant women on the coast of Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; 92(5): 549-553.
60. Morales L, Hayes B. Pica may be harmful to the fetus and mother. *West J Med.* 2000; 173(1): 25.
61. Hamilton S, Rothemberg SJ, Khan FA, Manalo M, Norris K. Neonatal lead poisoning from maternal pica behavior during pregnancy. *J Natl Med. Assoc.* 2001; 93(9): 317-319.
62. Silvany-neto AM, Carvalho FM, Tavares TM, Peres MF, Lopes R, Rocha CM. Lead poisoning among children of Santo Amaro, Bahia, Brazil in 1980, 1985 and 1992. *Bull Pan Am Health Organ.* 1996; 30(1): 51-62.
63. Mengel C, Carter W, Horton E. Geophagia with iron deficiency and hypokalemia. *Arch. Inter. Med.* 1964; 114: 470-473.
64. Klitzman S, Sharma A, Nicaj L, Vitkevich R, Leighton J. Lead poisoning among pregnant women in New York City: Risk Factors and Screening practices. *J Urban Health* 2002 Jun 1; 79(2): 225-237.
65. Rothemberg SJ, Manalo M, Jiang J, Khan F, Cuellar R, Reyes S, Sanchez M. Maternal blood lead level during pregnancy in South Central Los Angeles. *Arch. Environ. Health.* 1999; 54(3): 151-157.
66. Gudson J, Tunca F. Pica mimicking abrupt. placenta. *Obstetr Gynecol* 1974; 43:197-198.
67. Key T, Horger E, Miller J. Geophagia as a cause of maternal death. *Obstet Gynecol* 1982; 60: 525-526.
68. Singla PN, Tyagi M, Shankar R, Dash D, Kumar A. Fetal iron status in maternal anemia. *Acta Paediatr.* 1996; 85(11): 1327-1330.
69. Scholl T, Hediger M. Anemia and iron deficiency anemia: compilation of data on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 1994; 59 (Suppl): 492-501.
70. Hallemborg L. Iron balance in pregnancy and lactation en: *Vitaminas and minerals in pregnancy and lactation.* Ed. Berger. Nestlé Nutrition. Workshop Series. 1988;16:115-127.
71. Ministerio de Salud de la Nación. UNICEF. Prevención de la anemia por deficiencia de hierro en niños y embarazada: Manual del participante. Buenos Aires. 2001.
72. Van Wouwe JP. Clinical and laboratory assessment of the zinc deficiency in Dutch children. A review. *Biol. Trace Elem. Res.* 1995; (2-3): 211-225.
73. Keith A, McCall E, Chih-chin Huang, Fierke A. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes *J Nutr.* 2000; 130:1437S-1446S.
74. Cousins T. Zinc, en: *Conocimientos actuales sobre nutrición.* International Life Science Institute y Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. 1997. 7ma Edición Pág. 362-367.
75. King J C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am J Clin. Nutr. Suppl.* 2000; 71:1334S-1343S.
76. Wood R. Assessment of Marginal Zinc Status in Humans. *J Nutr.* 2000; 130:1350S-1354S.
77. Lonnerdal B. Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *J Nutr.* 2000; 130:1378S-1383S.
78. Hambidge M. Human Zinc Deficiency. *J Nutr.* 2000; 130:1344S-1349S.
79. Wellinghausen N. Immunobiology of gestational zinc deficiency. *Br J Nutr.* 2001 May; 85 Suppl 2: S81-86.
80. Rached-Paoli I, Azuaje Sánchez A, Henríquez Pérez G. Estado nutricional en gestantes de una comunidad menos privilegiada de Caracas. *An Venez Nutr.* 2002;15(2):94-104.

Recibido: 15-08-2003

Aceptado: 10-12-2003

Lactação e álcool: Efeitos clínicos e nutricionais

Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos, Francisca Martins Bion, Florisbela Campos

Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO. O consumo de bebidas alcoólicas por lactantes vem despertando a atenção dos pesquisadores, nas últimas décadas, com significantes achados relacionados à lactantes e lactentes. Bebidas alcoólicas estão incluídas, pelo Ministério da Saúde americano, como droga anestésica e sedativa, que se transfere para o leite materno, a partir do consumo de 1g/kg/dia. Este estudo realizou uma metanálise das principais publicações nacionais/internacionais, nas últimas décadas, relacionadas ao tema lactação X álcool. Resultados de estudos experimentais e com humanos relacionados ao consumo de álcool por lactantes sugerem: modificação do comportamento, com valores reduzidos de hormônio luteinizante e produção de leite, com aumento na quantidade de gordura e redução de lactose; aumento da lipogênese, na atividade da lipase lipoprotéica e hormônio sensível, alterações nas estruturas celulares epiteliais da mama, anormalidade na produção da caseína: redução na liberação da oxitocina e prolactina, provocando diminuição na ejeção do leite, diminuição de peso e conteúdo proteico da mama. Nos recém-nascidos observa-se redução no consumo alimentar, no peso corporal, no crescimento, desenvolvimento, glicogênio hepático, glicemia, aminoácidos plasmáticos, insulina, glicerol, ácidos graxos e uremia, aumento de acetoacetato no sangue, quando amamentados por animais alcoolizados na gestação/ lactação; a ingestão na lactação provoca nas crias alterações no fígado como redução de peso, triglicérides, proteínas, DNA e lipídios; no sangue: baixa de proteínas, triglicérides, colesterol, ácidos graxos, glicerol, com elevação de β -hidroxibutirato; alteração do sistema motor e do comportamento. A análise dos parâmetros envolvidos sugere a necessidade de mais estudos, que possibilitem estabelecer com segurança, o limite mínimo de consumo de álcool que poderá provocar efeitos patológicos no binômio mãe/filho.

Palavras chave: Lactação, álcool, lactantes, nutrição materna, nutrição neonatal

SUMMARY. Lactation and alcohol: Clinical and nutritional effects. Researchers have turned their attention to the effects of alcohol consumption on breastfeeding, with significant negative findings concerning both the mother and the newborn. This study is a meta-analysis of the principle research performed in the last decade that was concerned with lactation and alcohol. Results from experimental and human subject research has shown that effects of alcohol include: behavioural changes, reduced milk and luteinising hormone production, with increased fat content, reduced lactose content. Increased lipogenesis and increased activity of lipoprotein and hormone-sensitive lipase, structural alterations in the epithelial cells of the breast and abnormal casein production, reduced oxytocin and prolactin production with subsequent reduced milk ejection, and reduced weight and protein content of the breast. Reduction in food consumption, body weight, growth and development and hepatic glycogen, serum glucose, amino-acids, insulin, glycerol, fatty acids and urea, and an increase in serum acetoacetic acid is seen in newborn children that were breastfed by animals with a high intake of alcohol during pregnancy or the puerperal period. Alcohol consumption during lactation caused a reduction in liver weight and triglyceride, protein, DNA and lipid content, in the newborns. Serum changes included a reduction in protein, triglyceride, cholesterol, fatty acid and glycerol level with an increase in β -hydroxybutirate levels. Changes also included alterations in the motor system and behaviour. Further studies are needed to determine, with confidence, the minimum level of alcohol consumption that can provoke pathological effects in both the mother and the child.

Key words: Lactation, alcohol, breast-feeding mothers, maternal nutrition, neonatal nutrition.

INTRODUÇÃO

A lactância é o resultado da interrelação de hormônios, do instinto, dos reflexos e do comportamento da mãe e do recém nascido (RN). Vários autores têm estudado os fatores envolvidos com a produção e liberação do leite materno (LM), relacionando estado nutricional materno, peso do RN, álcool, *stress* e interação de medicamentos com a produção láctea (1).

Del Rio (1) afirma ser importante para um aleitamento ideal, incluindo estado nutricional materno adequado, suspensão de fumo, bebidas alcoólicas, redução do *stress* e suspensão de medicamentos que interfiram na lactação. Por outro lado, o RN necessita de peso maior que 3 kg, colocação precoce ao seio, tempo de sucção maior que 15 minutos e alta frequência de mamadas.

O aleitamento constitui indiscutivelmente o melhor alimento para o RN, com período de lactância ideal exclusivo

até os seis meses de vida, podendo ser complementado com outros alimentos, até 1 ano.

Nos países em desenvolvimento, grande número de programas de alto custo, financiados por organismos nacionais e internacionais, se direcionam ao incentivo ao aleitamento materno como importante fator de redução de morbimortalidade.

No Brasil, as últimas estatísticas acerca do aleitamento são do PNSN (Programa Nacional de Saúde e Nutrição) (2), indicando que 97% dos RN mamam logo após o nascimento e 61% permanecem mamando até os seis meses. Estas estatísticas positivas têm alertado os profissionais acerca do perigo de transmissão de alguns agentes infecciosos, produtos químicos e drogas, via LM. (3).

Mennella (4) citando Raider alerta para a segurança que se faz necessária em relação ao potencial de exposição ao álcool excretado no LM, especialmente a partir de estudos de Little et al. (5-7) evidenciando que as mães alcólicas não modificam o hábito de consumir bebidas no período de lactância (8,9).

Em 1983, o álcool já era catalogado como droga que passa ao LM, com sua ingestão necessitando ser abolida durante todo o período de amamentação (10).

Tradicionalmente, o álcool tem sido recomendado a lactantes, com o objetivo de melhorar a amamentação, suplementando ainda calorias e fluidos (3,11).

Relatos folclóricos indicam que, especialmente antes do horário de aleitamento, as bebidas alcoólicas aumentam a produção do leite, facilitando sua ejeção e relaxando o binômio mãe X filho (12,13). No Brasil, o consumo de cerveja preta é tido como "lactagôgo", pelas lactantes (14); entretanto, não há evidências científicas que respaldem estas orientações. A ausência de recomendações médicas e nutricionais acerca do consumo de bebidas alcoólicas no período de aleitamento pode refletir o fato de que a síndrome do alcoolismo fetal (FAS) foi identificada pela primeira vez na literatura, por Jones em 1973, sendo bastante reduzido, até esta década, o percentual de mulheres que consumiam álcool (15).

Nos países da América Latina, o consumo de bebidas alcoólicas pelo sexo feminino vem aumentando dramaticamente nos últimos 10-20 anos, sendo ainda reduzido o número de pesquisadores interessados na abordagem do tema; somente a partir de 1990 é que estudos sobre alcoolismo feminino passaram a ser freqüentes nas publicações científicas (16).

No Brasil, dados preliminares levantados pela Universidade Federal de São Paulo (2000) constatam uma prevalência de 6,6% de alcoolismo na população de 24 municípios de São Paulo, com predominância masculina, porém com prevalência de 19,16% na população feminina (17).

O objetivo desta revisão é proporcionar uma visão geral dos efeitos clínicos e nutricionais provocados por consumo de bebidas alcoólicas, em mães lactantes e seus lactentes. A metodologia utilizada foi uma revisão bibliográfica criteriosa em MEDLINE, bibliotecas nacionais e internacionais indexadas, catálogos de obras de referências nas áreas de nutrição, medicina, farmacologia, ciências biológicas e experimentais.

O álcool na antiguidade: componente dietético e fonte calórica

Dentre os povos antigos, egípcios, babilônios, hebreus, assírios, gregos e romanos, a água era rejeitada por unanimidade, como alimento ou bebida. Através dos anos foi a água veículo de doenças e principal causa de mortalidade nas grandes comunidades. Não obstante, a partir do século XIX os indivíduos civilizados consideravam a água como um líquido insubstituível para o consumo humano.

Nos períodos anteriores ao século XIX não eram conhecidas as infecções bacteriológicas; portanto, não eram utilizados os métodos de purificação da água, como a fervura, que destrói bactérias e parasitas, pelo desconhecimento de seus efeitos benéficos (18).

Durante séculos, a cerveja e o vinho, e não a água, eram os líquidos mais consumidos, em todas as idades (18). Como componente da cerveja e do vinho, o etanol foi consumido em quantidades moderadas ao longo dos séculos, com muito pouca ou quase nenhuma consequência individual ou social. Posteriormente, o consumo excessivo destas bebidas passou a representar sérios problemas e, como tal, foi objeto de debates e consenso dentre os filósofos da época, como Platão, Sócrates, Xenofan (19), observaram no consumo excessivo não mais os objetivos primários do consumo de vinho e cerveja, que eram centralizados nos efeitos para "inspiração, socialização e tranqüilidade" (18).

Alguns pesquisadores naquela época consideravam o álcool o maior constituinte da dieta humana, essencial não somente para suprir e manter o "equilíbrio hídrico", como para prover calorias (18-20).

A dieta comum das civilizações ancestrais baseava-se em cereais que forneciam 4cal/g diretamente a partir dos carboidratos (CH) e 7cal/g, quando fermentados a etanol, o que contribuía com percentagem significativa na ingestão diária. A cerveja, além destas fontes calóricas, contribuía com nutrientes adicionais, como vitaminas e minerais.

O valor nutricional da cerveja e do vinho passou a ser dividido com a essencialidade do pão, considerado imprescindível à vida. Na Idade Média não eram conhecidos medicamentos, sendo os diversos tratamentos ineficazes, com registro de epidemias que chegaram a dizimar 2/3 da população européia de uma só geração. Neste período, o álcool, inicialmente na forma de vermute, causou enorme

euforia na comunidade médica, sendo considerado um maravilhoso e surpreendente “remédio para doenças graves”, “chave da longevidade”, elemento novo, somente então revelado ao homem, apesar de conhecido na Antigüidade (20).

Consumo de álcool no mundo atual

A ingestão de bebidas alcoólicas é um hábito freqüente e generalizado em muitos países, seja no Oriente ou no Ocidente. O uso de substâncias, como o álcool, capazes de modificar o humor e o comportamento, tem sido considerado “normal” e até apropriado, sob certas circunstâncias, tais como: supressão da tensão, eliminação da dor, aumento do apetite e da produção de leite (13, 21).

O etanol é a droga ativa mais largamente consumida, sendo o alcoolismo (síndrome de dependência alcoólica) considerado um problema maior do que a farmacodependência na América Latina, onde as bebidas alcoólicas já eram consumidas antes da chegada dos europeus (22). Atualmente, o alcoolismo é considerado o maior problema de saúde pública, com conseqüências irreversíveis sobre o organismo sadio adulto, na maioria dos casos só ocorrendo, em média, após 10 anos de consumo (23). Segundo Schuckit (24), 90% dos indivíduos ingerem álcool, 40-50% dos homens apresentam problemas temporários induzidos pelo seu consumo, enquanto 10% dos homens e 3-5% das mulheres podem desenvolver distúrbios persistentes e generalizados, embora individualmente variáveis, dependendo dos fatores ambientais e genéticos.

Nas pesquisas relacionadas à ingestão de álcool, as interações calorias X fatores ambientais são os enfoques mais abordados, com fortes evidências de que a nutrição pode afetar o seu consumo. Por exemplo, em animais dieta rica em carboidrato e baixa em proteínas reduz o consumo alcoólico, enquanto uma dieta hipoglicídica/hiperprotéica produz efeito inverso (25).

A resposta do organismo à ingestão de álcool é bastante variável (26), dependendo da dose ingerida, da concentração na bebida e no sangue, bem como das variações individuais na capacidade de metabolização, relacionadas a sexo, idade, raça, genética (27), estado nutricional, uso concomitante de medicações e patologias (23). O desenvolvimento de doenças crônicas, como cirrose e pancreatite crônica, depende da quantidade de álcool e da composição da dieta consumida (23-28). Em geral, as bebidas alcoólicas constituem uma fonte importante de calorias, apesar de não serem eficientemente utilizadas como combustível e armazenadas como gordura (29).

Efeitos nutricionais da ingestão de bebidas alcoólicas

Alterações nutricionais ocorrem após ingestão em longo prazo e/ou altas doses. O álcool é uma molécula fracamente carregada que se move com facilidade através das membranas

celulares, atingindo rapidamente um equilíbrio entre o sangue e os tecidos.

Sua absorção ocorre na boca e no esôfago, em quantidades reduzidas, e principalmente no intestino delgado, com alta velocidade de absorção, no esvaziamento gástrico e na ausência de proteínas, carboidratos, gorduras, fenóis, tiamina, ferro, chumbo e cobalto (24). Seu metabolismo inicial ocorre no fígado, por ação de várias enzimas (30). Quantitativamente, a mais importante é a álcool desidrogenase citosólica, que é inibida pelo consumo crônico de álcool e reduzida com o aumento da idade, produzindo acetaldéido, com transferência de H⁺ para NAD, reduzindo-o para NADH⁺, levando à depressão do ciclo de Krebs, que requer NAD para seu funcionamento normal (31).

Vários são os distúrbios metabólicos pelo excesso de NADH⁺, inicialmente anulando a capacidade celular de manter um estado normal de redox, provocando hiperlactacidemia, acidose, hiperuricemia e hiperlipidemia. A mitocôndria usa H a partir do etanol, deixando de utilizar ácidos graxos para produzir energia no ciclo de Krebs, levando a uma redução na oxidação de ácidos graxos e acúmulo de triglicerídeo. Nesta situação, o NADH poderá promover a síntese de ácidos graxos (31).

Em relação aos macronutrientes, há evidências científicas de que o álcool altera o metabolismo intermediário dos carboidratos, lipídeos e proteínas (32). A ingestão de 70g de álcool reduz o metabolismo protéico no fígado humano, com alterações na síntese e/ou secreção de proteínas como o fibrinogênio, ocorrendo, em alguns casos, disfunções hepáticas e hipoalbuminemia na ausência de desnutrição (33).

Em relação aos micronutrientes também são observadas alterações significativas, decorrentes da ingestão de álcool.

O déficit de folato, devido à sua função na replicação celular do intestino delgado, contribui para a ocorrência da diarreia em alcoólicos, relacionada com a má absorção de nutrientes hidrossolúveis, como o folato e a glicose (37), com inibição da metionina sintetase, provocando alteração na regulação dos nucleotídeos e provavelmente aumentando o risco de câncer (38). A etiologia desta deficiência no alcoolismo é multifatorial; dentre os fatores, podem ser mencionados: dieta inadequada, má absorção da forma monoglutamílica da vitamina, alterações do metabolismo hepatobiliar e aumento da perda urinária, devido à redução na reabsorção tubular renal; segundo esta linha de pensamento, o etanol inibe os possíveis e conhecidos transportadores do folato nas membranas intestinal, hepática e tubular renal. Por outro lado, o acetaldéido desencadeia **in vitro** o catabolismo oxidativo da molécula do ácido fólico (37).

Em relação à tiamina, não se conhece a prevalência desta deficiência, porém em 2,2% das autópsias consecutivas de alcoólatras foram encontradas lesões neuropatológicas deste

transtorno, que consiste na Síndrome de Wernick – Korsakoff, com oftalmoplegia, ataxia e alterações de memória, neuropatia periférica, distúrbio mental e perda da capacidade de concentração. A deficiência desta vitamina ocorre por ingestão de dieta inadequada associada à má absorção no alcoolismo, por inibição da enzima Na-K-ATPase na membrana do enterócito (37).

A piridoxina também se apresenta deficiente no alcoolismo crônico, fato explicado, em parte, pelo deslocamento da forma ativa da vitamina, o Piridoxal – S – Fosfato, pelo acetaldeído, que ocorre na proteína captadora de vitamina, provocando aceleração da perda urinária de piridoxina (35).

A vitamina A se encontra reduzida, provavelmente pela deficiência na absorção, estando as secreções biliares e pancreáticas reduzidas, sendo ainda a causa do efeito na oxidação microsomal induzida pelo etanol sobre o recâmbio na excreção biliar dos metabolitos da vitamina A (34).

Entre os minerais depletados pelo álcool, o zinco é o mais estudado em modelos animais e humanos; baixos níveis de zinco ocorrem no soro e tecidos hepáticos (38). A causa da deficiência é o consumo de dietas inadequadas em proteínas ricas em zinco, ocasionando redução na absorção intestinal e aumento na excreção urinária em relação aos baixos níveis de albumina captadora de zinco (39). Ocorre ainda uma redistribuição nos depósitos de zinco, com aumento na captação dos tecidos, em resposta a diversas citocinas que intervêm na lesão alcoólica do fígado (40). As consequências clínicas consistem em dermatites, alterações do paladar e olfato, podendo contribuir para a anorexia, cegueira noturna, diminuição na produção de testosterona, alteração da imunidade celular e retardo na cicatrização de feridas (41).

Outro mineral recentemente investigado em relação ao consumo de álcool é o cálcio. Fische et al. (42) constatam importante relação no consumo de soft drinks e redução do consumo de leite e cálcio.

Efeitos teratogênicos em humanos e animais

Historicamente, o álcool tem sido relacionado com efeitos adversos sobre o RN (43). Em 1834, na Inglaterra, a Câmara dos Comuns relatava que “crianças de mães alcoólicas têm muitas vezes um aspecto caquético desnutrido (44). O primeiro trabalho empírico sobre os efeitos da ingestão de bebidas alcoólicas na gestação data de 1899, realizado em Liverpool, constatando mortalidade 56% superior em RNs de mães alcoólatras, em relação àqueles de mães não alcoólatras, concluindo que a “intoxicação materna” era a causa das alterações fetais (43). Não obstante dados tão contundentes, nos 50 anos que se seguiram reduzidas pesquisas foram realizadas abordando o assunto (45).

Segundo Streissguth (43), em 1942, Haggard & Jellimek estudaram RNs de mães alcoólatras, desnutridas, vivendo em

ambiente com elevada carga de *stress*, atribuindo a estes fatores os problemas detectados, descartando os efeitos tóxicos do álcool. Posteriormente, na França, em 1957, Rouquette descreve claramente as malformações congênitas, o déficit de crescimento e o desenvolvimento retardado dos RNs de mães alcoólatras (18).

Atualmente, já se encontra bem caracterizada a síndrome do alcoolismo fetal, cujas características básicas são retardo do crescimento pré-pós natal, disfunção do sistema nervoso central (intelectual, neurológica e comportamental) e alterações faciais (olhos, nariz, maxilar, lábio) (15, 43, 45-47).

Estudos prospectivos avaliando os efeitos do hábito de ingerir *drinks* sociais na gestação evidenciaram déficit no crescimento intra-uterino, má-formação congênita, baixo escore de apgar, anormalidade para sucção, inatividade, dificuldade de adaptação às situações, desorientação da cabeça e outros órgãos relacionados ao Sistema Nervoso Central (13, 43, 48).

As evidências acerca dos efeitos da ingestão de álcool podem ser mais bem observadas em estudos com animais, particularmente importantes pela possibilidade de criar e analisar situações e fatores, o que seria impossível em humanos (43, 49). Os efeitos do álcool, nestes estudos, foram semelhantes ou, em alguns casos, mais graves do que nos humanos (50-60), com diferenças de sensibilidade genética para o álcool, já detectado no período intra-uterino (27).

Consumo de bebidas alcoólicas e etanol no período contínuo de gestação - lactação

Renomados pesquisadores têm demonstrado que a ingestão prolongada de bebidas alcoólicas durante a gestação-lactação provoca alterações e efeitos tóxicos no feto e no RN (5,15,25,60,61).

Em humanos, os efeitos do álcool nestes períodos foram descritos inicialmente por pesquisadores franceses em 1968 e posteriormente confirmados e explicados parcialmente por outros estudiosos (15,62).

A utilização do etanol como parte da dieta líquida em animais experimentais foi testada pela primeira vez em 1972. A partir deste modelo experimental, várias alterações na gestação-lactação foram constatadas, incluindo fígado gorduroso, hiperlipidemia, desordens metabólicas e endócrinas, tolerância e dependência ao álcool e outras drogas. Nestes estudos em animais foi observado que, não obstante a ingestão de dietas com teores protéticos de 18-25%, quando associadas ao álcool provocavam efeitos adversos nos RNs, como cirrose e fibrose hepática, desenvolvimento anormal, bem como modificações comportamentais na lactante (63,64), evidenciando que estas alterações são provocadas pelo álcool e não pela desnutrição.

Por outro lado, o status nutricional materno, quando

avaliado por antropometria (índice de massa corporal, prega cutânea do tríceps, circunferência muscular do braço) sofre modificações positivas quando a mãe consome bebidas fermentadas nos 2 períodos em estudo (65). Por outro lado o mesmo não ocorre com os filhotes, nos quais a lactante ingere etanol a 12%, induzindo deficiência no metabolismo da tiamina (66).

Estudo sobre fertilidade e sobrevivência de crias, realizado em duas linhagens sensíveis ou não ao etanol, alimentadas com dietas à base de etanol a 10%, evidenciou que os animais com baixa sensibilidade são duas vezes mais férteis, exercendo grande atividade sexual; na gestação e, principalmente, na lactação, o álcool aumentou a mortalidade dos filhotes sensíveis, fato agravado pelo canibalismo (67). Também foi observada redução na ingestão hídrica nas duas linhagens, especialmente na lactação. Vilaró et al. (68) observaram significativo retardo de crescimento nas crias de mães alcoolizadas durante a gestação/lactação; evidenciaram também alterações no metabolismo da lactente, com diminuição no glicogênio hepático, níveis de glicemia, aminoácidos, insulina, glicerol e ácidos graxos, bem como na mãe aumento da uréia e acetoacetato sanguíneo, redução na produção láctea, concomitante ao aumento da gordura e atividade da lipase lipoprotéica na mama e menor concentração de lactose.

O álcool ingerido na gestação/lactação poderá afetar o desenvolvimento pós-natal de funções intestinais, com redução de absorção de zinco no íleo distal de ratos no fim da lactação (21 dias) (69). No entanto, suplementação de ácido fólico e aminoácidos às mães provocou aumento do zinco no sangue e LM, com aumento de absorção jejunal e ileal e atividade da enzima álcool desidrogenase (dependente de zinco) (70). Efeitos deste nutriente na proteção da saúde da prole e na prevenção dos danos oxidativo/alcoólico foram sugeridos por Cano et al. (71).

O metabolismo lipídico da glândula mamária foi avaliado por Sreeranjitkumar (72) em condições experimentais, usando dietas à base de etanol e bebidas fermentadas, evidenciando, no 19º dia de gestação e 21º de lactação, elevação do colesterol, fosfolípidos, triglicerídeos e ácidos graxos na glândula. Por outro lado, ingerindo os dois tipos de bebida, os grupos decresceram o peso absoluto e relativo da mama, com aumento da atividade da lipase lipoprotéica (21º dia de lactação). No entanto, Tavares do Carmo (73) encontrou redução do peso absoluto e do conteúdo protéico, com aumento da taxa de lipogênese, sem alterar o conteúdo lipídico da mama.

Alterações bioquímicas também foram estudadas em ratos alimentados com bebida fermentada (Arrack) e etanol, sendo observado que a porção não alcoólica da bebida interfere na toxicidade do álcool, reduzindo o efeito hiperlipídico (72).

Um das alterações patológicas decorrentes da ingestão

de álcool é a alteração da contratilidade cardíaca e hiperplasia do coração (74). Fuseler estudando ratos no período de gestação e lactação, descreve o declínio da relação peso cardíaco/peso corporal, sugerindo mecanismo intrínseco protetor contra os efeitos do álcool (74). Análises histopatológicas revelaram hiperplasia transitória no coração, com ocorrência de aumento da atividade mitótica dos miócitos.

A interação álcool X drogas nos mamíferos adultos é outro aspecto que vem sendo pesquisado, sendo necessário um maior número de estudos referentes ao período neo-natal. Quase todas as drogas são detectadas no LM; exames específicos têm demonstrado o etanol passando da circulação materna para o feto, assim como para o lactente, via LM (76, 77).

Rawat (77) estudando a interação etanol X chlorpromazine na gestação/lactação, constatou aumento do metabolismo hepático da droga nos RN, comparando com os fetos; conclui que o álcool inibe o metabolismo normal das drogas em fetos e RN, via LM.

Vale ressaltar que a exposição fetal ou neonatal (via LM) ao álcool, pode induzir malefícios ao sistema imunológico, levando à diminuição da resistência a infecções. Os efeitos deletéricos sobre o desenvolvimento do sistema imunológico dos RN e a resposta imunológica precoce têm sido bem documentados (78). Nos períodos pré-pós gestacional ocorrem alterações nos tecidos linfóides intestinais, baixo peso do timo, redução de linfócitos T e T citotóxico, Ig A plasmática e macrófagos (79). Estes achados sugerem que a exposição pré-pós natal ao etanol tem efeitos no desenvolvimento ou influxo dos leucócitos intestinais, com mais significância no período pós-natal (79).

A Síndrome de Alcoolismo Fetal (FAS) representa atualmente um grande problema de saúde pública, devido ao quadro irreversível de retardo mental e físico do RN. A ingestão de etanol na gestação provoca diferenças comportamentais maternas, como: desorientação, pouco envolvimento com as crias, falta de interesse e cuidados, e perda de sensibilidade a estímulos externos (66). A administração de dietas com etanol, fornecendo 1/3 das calorias totais na gestação – lactação, provoca retardo do crescimento corporal e do sistema nervoso central (80), mais pronunciado na lactação, evidenciado pelo crescimento da cauda do animal e do cérebro (2a e 3a semana pós-natal).

Alterações nutricionais são menos graves do que as produzidas pelo álcool no sistema nervoso central e no crescimento pondo-estrutural (60).

A composição lipídica das células do sistema nervoso central de lactentes sofre a ação do álcool, com aumento de galactolipídeos no cérebro e medula, lipídeos da mielina (maior concentração de fosfolípidos), aumento na incorporação de glicose nas membranas celulares, sugerindo

uma maior produção lipídica. Na circulação cerebral observa-se maior teor de colesterol, fosfolípidos, esfingomielina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (81).

Em 1998, Vanglenova & Petkov (82) alertam a comunidade científica para os efeitos do etanol na gestação e lactação, com prejuízo na área do aprendizado, memória (no período de adolescência) e aumento da mortalidade. Os mecanismos envolvidos nas anormalidades no FAS até pouco tempo não eram bem entendidos, principalmente se os tecidos embrionários sofriam ação direta do álcool ou seus metabólicos. Atualmente, está claro em animais o envolvimento de vários fatores maternos, nutricionais e comportamentais, modificados na gestação e lactação por alta/baixa concentração de etanol, sendo seu efeito per si, e não o acetaldéido, responsável pelas alterações (83).

Estudos recentes indicam que exposição alcoólica nestes períodos de desenvolvimento cerebral altera a expressão das moléculas adesivas das células neurais, sugerindo a possibilidade de serem afetadas as interações neuronal glial, contribuindo para os defeitos cerebrais (84,85). Por outro lado, dietas contendo 20% de álcool alteram as células piramidais, podendo modificar a excitabilidade elétrica, devido aos efeitos tóxicos (85).

Álcool e lactação

Os efeitos decorrentes do uso de substâncias como etanol, cafeína, nicotina e outras, permitidas socialmente, vêm sendo pesquisados por vários autores, com evidências de que o álcool passa ao LM em grandes proporções, alterando a produção, volume, composição e excreção láctea, provocando efeitos deletérios nos RN (4,11,50-54, 84, 86).

A maioria das gestantes tem conhecimento de que não deve consumir álcool neste período; o mesmo não ocorre na lactação, vez que a cerveja tradicionalmente e, em menor grau, o vinho, são recomendados como lactogôgos, fontes de vitaminas do complexo B e capazes de provocar o relaxamento mãe/filho (87).

Menella & Beauchamp¹³ investigaram os efeitos do álcool no lactente, evidenciando que o odor do LM é modificado imediatamente após sua ingestão. O lactente, apesar de sugar de forma mais vigorosa, ingere menos leite por tempo de sucção, fato não percebido pelas mães. Posteriormente, em 1993, os mesmos autores concluíram que não só o *flavor* prejudica o RN, mas também o álcool “per se”.

Segundo alguns autores (88-91), o sistema imunológico é afetado pela ingestão alcoólica na lactação, sendo observado déficit, a longo prazo, na imunidade celular e no sistema nervoso, indicando sensibilidade ao álcool em etapas precoces do desenvolvimento de animais (87).

Alguns efeitos maternos são evidenciados em decorrência da ingestão de álcool na gestação - lactação. As variações no peso feminino também afetam a desintoxicação alcoólica, as

magras necessitando de maior tempo para metabolizar a mesma quantidade de álcool (87).

Comparando mulheres lactantes ou não, quanto à absorção do etanol (após agrupamento por idade, peso e etnia), Silva et al (92) observaram que as lactantes têm menor absorção em menor período. Por outro lado, a alcoolemia, que é semelhante ao teor de álcool no LM, foi menor nas lactantes, conseqüentemente a taxa de captação de álcool pelo fígado deve ser diferente, devido à menor quantidade de álcool circulante.

As pesquisas pioneiras de Lawton (93) evidenciaram que o teor de álcool no LM é diretamente proporcional ao do sangue, não sendo afetado por sucção ou aleitamento pré-pós ingestão de álcool. À medida que a droga vai chegando ao sangue, também vai se acumulando no leite.

Schuckit (94) demonstra o tempo de metabolização de bebidas alcoólicas a partir do peso de mulher não lactante; assim, enquanto uma mulher normal de 45 kg que ingere 200 ml de bebida levaria 3,1 hora para eliminação corporal, outra de 72 kg levaria 1,9 hora.

Por outro lado, na lactação observa-se redução no consumo alimentar e no peso corporal (95, 96), com maior acúmulo de lipídeos nas mamas (97).

Pesquisa realizada, em 1989, no Instituto Nacional de Saúde Infantil e Desenvolvimento Humano, nos Estados Unidos, detectou diferenças significativas no desenvolvimento motor de RN de mães que bebiam de forma regular (87). Efeitos tóxicos do uso de álcool levam a alterações, dependendo da idade da criança (fígado imaturo será mais afetado), IMC da mãe, quantidade e concentração da bebida consumida, período de jejum ou pós-prandial e quantidade de gordura consumida, que reduz a absorção do álcool (64).

Redução pondo-estatural (60,64, 95, 98,99) e aumento da mortalidade neo-natal foram encontrados por diversos autores (64,82,99-101). Várias alterações metabólicas e hormonais maternas, conseqüentemente na composição do LM, bem como na metabolização do etanol, repercutem de forma significativa no desenvolvimento das crias (99). Foram também observadas alterações nos RNs após consumo de 20% de álcool, com redução do peso do fígado, cérebro, diminuição do conteúdo protéico e do DNA, bem como dos níveis de glicogênio hepático, sem alterar os lipídeos destes tecidos, na circulação, elevação de colesterol, ácidos graxos e de β -hidroxibutirato; presença de hipoglicemia e hiponatremia (99).

Sensibilidade genética ao etanol

Diferenças genéticas ocorrem nas respostas de animais e humanos após ingestão de álcool. Em trabalho com camundongos, Swanberg (102) analisou o comportamento materno e sobrevida da prole, ingerindo etanol a 10% na

água, durante 14 dias de lactação; evidenciou redução do crescimento e da sobrevivência em linhagens com e sem sensibilidade alcoólica, com poucos sobreviventes dentre os animais mais sensíveis. A combinação de infecção ambiental e álcool na lactação tem efeito devastador nos grupos sensíveis à droga, sugerindo que estes são mais susceptíveis aos variados agentes estressantes, incluindo o álcool (102).

Aspectos nutricionais e características sensoriais do leite materno contendo etanol

A ingestão de bebidas alcoólicas por lactantes altera o flavor do leite e expõe o RN ao etanol, provocando efeitos imediatos sobre o seu comportamento (11,13,103,104). Após 30 minutos de ingestão, o álcool já está presente no leite, alcançando seu platô aos 60 minutos, independentemente do volume, quando consumido na forma de bebida fermentada (105).

A composição do leite, em caso de consumo agudo, parece não ser alterada do ponto de vista energético, porém o volume é significativamente reduzido (106, 107), apesar do aumento do teor lipídico (107). Por outro lado, quando ocorre consumo crônico (a 20%), a fosfatidilserina aumenta significativamente no leite, apesar de ocorrer apenas aumento de colesterol no plasma.

Como ocorrem estas alterações e de que modo repercutem no desenvolvimento dos filhotes são aspectos que precisam ser mais bem estudados (108).

Alterações metabólicas

O consumo, pelo rato lactante, de água adicionada ao álcool (20%) provoca desnutrição protéica no RN, com déficit de crescimento, redução de proteína no fígado e plasma, apenas com 12 dias de lactação. Na lactante, ocorre decréscimo da proteína da mama, com aumento na lipogênese (97,109). Os mesmos autores, em 1996 (73), estudando o fígado de lactantes, constataram: redução do peso, da concentração de DNA, aumento lipídico e acúmulo hepático de triglicérides, resultando em baixos níveis de ácidos graxos livres e glicerol na circulação, aumento da taxa de lipogênese *in vivo* da mama e *in vitro* de ácidos isolados; maior utilização de glicose para síntese de lipídeos em ácinos da mama, com potencialização da lipogênese a partir da glicose em ácinos de animais-controle; aumento da lipase lipoprotéica (LPL) no tecido adiposo, sem alterar sua atividade glandular; e redução da lipase hormônio sensível na mama (73, 97,110). Entretanto, estes achados necessitam de maiores estudos, tendo em vista o conhecido processo de regulação lipólise/lipogênese.

Efeitos no sistema nervoso de lactantes/lactentes

As informações científicas acerca da ação do etanol via LM no crescimento e desenvolvimento de crianças são

limitadas ao estudo epidemiológico americano, realizado com 400 crianças de mães que consumiam álcool na lactação. Foi investigada a relação “álcool X desenvolvimento infantil até 1 ano de idade”, evidenciando alterações leves, porém significativas, no sistema motor, sem, no entanto, afetar a área mental (7). Por outro lado, alterações no *flavor* do LM modificaram o comportamento do binômio mãe/filho (11,111,112). Chestock (103) evidenciou modificação do comportamento de sucção dos recém-nascidos, com redução na atividade global do sistema motor. Na exposição ao etanol, via LM, as adaptações metabólicas que ocorrem nas crias não são suficientes para assegurar o desenvolvimento normal do cérebro (107).

Modificações funcionais no sistema nervoso central são visíveis em modelos experimentais, (113) como “tempo total de sono prolongado”, “convulsões”, “alterações da performance rotatória” e preferência por dietas alcoólicas (114); déficit no aprendizado (4º e 9º dia) foi também constatado, mesmo quando avaliado seis meses após a exposição alcoólica (115). Quando comparados em períodos de gestação/lactação, observa-se retardo no abrir de olhos naqueles submetidos a exposição alcoólica nos 2 períodos; redução na formação da mielina cerebral, peso diminuído do cérebro e órgãos foram mais severos na lactação e atraso de crescimento corporal mais significativo na gestação (116).

Na última década, vários estudos indicam que a exposição alcoólica pré e pós natal afeta os canais iônicos de neurotransmissores, receptores do hipocampo e do NMDA, sugerindo que estes efeitos podem estar envolvidos na etiologia das desordens neuro-psiquiátricas alcoólicas e no FAS (117).

Pesquisas *in vitro* com células cerebrais de animais recém-nascidos mostram apoptoses no desenvolvimento do córtex cerebral, nas doses de 950 mg/dl de etanol (118). A intubação intragástrica com álcool, em crias recém-nascidos (4º e 9º dia) revela modificações no “reflexo de piscar de olhos”, talvez associadas com a indução alcoólica de perda de células de Purkinje do cerebelo (119).

Adaptações hormonais durante a lactação

No período de gestação, lactação e puberdade o etanol poderá provocar modificações hormonais opostas àquelas descritas em outros períodos.

Efeitos deletérios do álcool sobre os parâmetros hormonais lactacionais dependem da quantidade da bebida ingerida e duração da alcoolemia, não sendo benéficos para a glândula mamária (48,120).

No que diz respeito à prolactina (PRL), observa-se que o álcool promove, em animais intubados por períodos agudos, inibição de sua elevação, que se segue à sucção. Por outro lado, o etanol não é capaz de alterar a secreção basal (121-123). Administração crônica de álcool provoca alterações

adversas na ejeção láctea, no crescimento dos RN e redução na liberação da PRL induzida pela sucção (51), levando a efeitos na inibição da produção láctea que ultrapassam o estímulo da sucção prolongada (50, 124). No consumo de cerveja, aparentemente uma substância não alcoólica (polissacarídeo da cevada) é responsável pelo estímulo à secreção de PRL (125,126).

Modificações hormonais induzindo à puberdade precoce, sem alterações na fertilidade, foram observadas recentemente (127).

Em relação aos neurotransmissores são evidenciados um aumento na concentração de noradrenalina no sistema hipocampo/hipotálamo, durante o desenvolvimento neural, em ratas, e redução da serotonina no hipotálamo, em ambos os sexos (128).

Rovinski & Hosein (129) observaram, em crias de ratos, redução dos receptores adrenérgicos alfa-1 das membranas plasmáticas hepáticas; por outro lado, evidenciaram, em fígados de RN, no 5o e 15o dia, 30% de redução de atividade da fosforilase hepática, estimulada pela epinefrina.

Nos estudos direcionados ao consumo e armazenamento de energia, o álcool aumenta a termogênese, provocando hiperplasia do tecido adiposo marrom nos RN, aumento de enzimas oxidativas e atividade simpática. A associação destes fatores, com *stress* emocional e infecções poderá conduzir à morte por hipertermia (130).

Em relação à oxitocina, ocorre inibição ao estímulo da lactação, resultando na redução de secreção láctea (131-134), também causada por diminuição do hormônio luteinizante (109). Quanto à insulina, não há informação sobre seu mecanismo na lactação, porém nos períodos contínuos gestação - lactação observa-se insulina e glicemia normais na lactação (109).

CONCLUSÕES

A ingestão de bebidas alcoólicas durante a lactação afeta o metabolismo materno, repercutindo no metabolismo e desenvolvimento dos recém-nascidos, não sendo conclusivo, até o momento, a partir de qual quantidade-limite a ingestão de ethanol provoca alterações fisiopatológicas e clínicas. Por outro lado, muito pouco é conhecido acerca dos efeitos do álcool sobre o sistema endócrino de lactantes e recém nascidos, composição do LM em nutrientes, metabólitos e fatores imunes.

De qualquer forma, é prudente desestimular a ingestão de ethanol pelas gestantes e pelas lactantes.

REFERENCIAS

1. Del Rio Vio. Bases fisiológicas y nutricionales para una lactancia materna exitosa. Rev Chil Nut 1993; 21: 19-32.
2. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição. Brasília, 1989.
3. Jason J. Breast-feeding in 1991. New England J Med. 1991; 325:1036-7.
4. Mennella JA. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. 1991.
5. Little RE, Kevin W, Anderson B, Ervin CH. Maternal alcohol use during breast-feeding and infant mental and motor development at one year. New England J Med 1990; 321: 425-31.
6. Little RE. Maternal use of alcohol and breast-fed infants - Reply. New England J Med 1990; 322: 339.
7. Little RE et al. Maternal alcohol use during breast-feeding and infant mental and motor development at one year. New England J Med 1989; 321: 425-30.
8. Menella JA. Infants' suckling responses to the flavor of alcohol in mothers' milk. Alcohol Clin Exp Res 1997; 21: 581-5.
9. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Report of a Subcommittee of the National Advisory Council on Alcohol Abuse and Alcoholism on the Review of the Extramural Research Portfolio for Fetal Alcohol Syndrome (FAS). Bethesda, 1997.
10. American Academy of Pediatric - Committee on Drugs. The transfer of drugs and other chemicals into human breast milk. Pediat 1983; 72: 375-83.
11. Menella JA, Beauchamp K. Effects of beer on breast - fed. J Amer Med Assoc 1993; 269:1637-68.
12. Blume S. Beer and breast-feeding mom. J Amer Med Assoc 1987; 15: 21-26.
13. Menella JA, Beauchamp K The transfer of alcohol to human milk. New England J Med 1991; 325. 981-5.
14. Vitolo MR, Patin RB, Von Bulow AC, Garzeli N, Fisberg M. Conhecimentos e credences populares de puérperas na prática da amamentação. R Nutr Puccamp 1994; 7: 132-47.
15. Jones KK, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth AP. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. Lancet 1973;1: 1267-71.
16. Monteiro MG. Alcohol research in Latin America. Alcohol Clin Exp Res 1996; 20: 176A-80A.
17. Galduroz JC. 1º levantamento domiciliar nacional sobre uso de drogas psicotrópicas. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2000.
18. Vallee BL. Alcohol in human history. In: Janon B, Jörnvall H, Rydberg U, Terenius L. In: Toward a molecular basis of alcohol use and abuse. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994.
19. O'Brien JM, Alexander E D. The invisible energy ann Scholar. 1980; 1: 31-46
20. Forbes RJ. Short history of the art of distillation. Leiden: E J Brill., 1970.
21. Grünspum H. Introdução à psiquiatria. In: Marcondes M. Clínica Médica - propedeutica e fisiopatologia. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1984.
22. Negrete, JC. El alcohol y las drogas como problemas de salud en America Latina. Bol Of Sanit Panam 1976; 81: 158-75.
23. Dantas, RO. Alcoolismo em trabalhadores da Zona Urbana e Rural. Uma experiência em Brasil. Bol Sanit Panam 1983; 94: 76-81.

24. Schuckit P. Minimizing alcohol exposure of the breastfeeding infant. *J Human Lact* 1995; 11: 317-9.
25. Forsander OA. Dietary influences on alcohol intake: a review. *J Stud Alcohol* 1998; 59: 26-31.
26. Lieber CS. Alcohol and liver. *Gastroenterology* 1994;106: 1085-1105.
27. Thomas JD, Burchett TL, Dominguez HD, Riley EP. Neonatal alcohol exposure produces more severe motor coordination deficits in high alcohol sensitive rats compared to low alcohol sensitive rats. *Alcohol* 2000; 20: 93-9.
28. Hammoumi S, Nassassila M, Daoust M. Experimental findings in the study of the reduction of alcohol intake. *Eur Neuropsychopharm*. 1997; 7: 337-40.
29. Prentice AM. Alcohol and obesity. *Intern J Obes* 1995; 19: 44-50.
30. OPS/ILSI. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6.ed. Washington, 1991.
31. Mahan KL, Escott-Stump S Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 10ed. Rio de Janeiro: Roca, 2000.
32. Halsted CH. Alcohol: efectos clínicos y nutricionales. In: OPS/ILSI. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. Washington, 1997; 584-93.
33. Halsted CH. Ethanol feeding of micropigs increased methionine metabolism and proliferation. *Hepatology* 1996;23:497-505.
34. Leo MA, Lieber CS. Hepatic vitamin A depletion in alcoholic liver injury in man. *N England J Med* 1982;307:597-601.
35. Leevy CM, Baker H, Tenhove EW. B-complex vitamins in liver disease of the alcoholic. *Am J Clin Nutr* 1965; 16: 339-46.
36. Volpi E. Moderate and large doses of ethanol differentially affect hepatic protein metabolism in humans. *J Nutr* 1998; 128: 198-203.
37. Halsted CH. Intestinal absorption in folate deficient alcoholics. *Gastroenter* 1973; 64:526-32.
38. Giovannucci E. Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum. *Int J Epidemiol* 1991; 20: 368-374.
39. Bergheim I., Parlesak A., Dierks C, Bode JC, Bode C. Nutritional deficiencies in German middle-class male alcohol consumers: relation to dietary intake and severity of liver disease. *Euro J Clin Nutr*, v.57, p.431-438, 2003.
40. MacClain CJ. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1989; 9: 349-51.
41. MacClain CJ. Zinc and alcohol. In: Watson RR, Watz B, editors. *Nutrition and alcohol*. Boca Raton: CRC Press, 1992: 281-308.
42. Fisher JO, Miychell DC, Smiciklas-Wright H, Birch LL. Maternal milk consumption predicts the tradeoff between milk and soft drinks in young girls' diets. *J Nutr* 2001; 131: 246
43. Streissguth AP, Dwyer SL, Martin JC, Smith DW. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 1980; 209: 353-61.
44. Warner RH, Rosett HL. The effects of drinks on offspring. As historical survey of the American and British literature. *J Stud Alc* 1975; 36: 1395-8.
45. Mitchell MC. Alcohol. In: OPS/ILSI. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6.ed. Washington, 1991: 530-5.
46. Climent E, Pascual M., Renau Piqueiras J, Guerri C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing series cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neuro Res*, v. 68, n. 2, p. 213-225, 2002.
47. Guerri C, Sanchis R. Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following ethanol administration. *Life Sci* 1986; 15:43-56.
48. Cobo E. Effect of different doses of ethanol on the milk-ejecting reflex in lactating women. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 115: 817-21.
49. Villaró S, Viñas O, Remesar X. Effect of chronic ethanol consumption on lactation performance in rat: mammary gland and milk composition and pup's growth and metabolism. *Pharmacol Biochem Behav* 1987a; 2: 333-9.
50. Lima LA, Melo-junior MR, Cavalcante CLB, Melo CB, Pontes filho NT. Does the exposition to alcohol in pre and post-natal periods interfere on the formation and maturation of Peyer's Patches? *An Fac Med UFPE*, v. 47, n. 1, p. 22-26. 2002.
51. Subramanian MG. Prolactin secretion in lactating rats following chronic alcohol exposure - provocative tests with secretagogues. *Life Sci* 1995; 57: 533-9
52. Subramanian MG. Alcohol inhibits suckling-induced oxytocin release in the lactating rat. *Alcohol* 1999; 19: 51-5.
53. Tomlinson D, Wilce P, Bedi KS. Spatial learning ability of rats following differing levels of exposure to alcohol during early postnatal life. *Physiol Behav* 1998; 63: 205-11.
54. Subramanian MG, Chen, XG, Bergeski, BA, Savoy-Moore, RT. Alcohol inhibition of suckling-induced prolactin release in lactating rats: threshold evaluation. *Alcohol* 1991;8:203-6.
55. Naassila M, Daoust M. Effect of prenatal and postnatal ethanol exposure on the developmental profile of mRNAs encoding NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *J Neuro*, v. 80, n. 5, p. 850-860, 2002.
56. Addolorato G. Prenatal exposure to ethanol in rats: effects on liver energy level and antioxidant status in mothers, fetuses and new borns. *Alcohol* 1998; 14: 569-573.
57. Wilson WR, Phillips KS, Leslie SW. Ethanol and glutamate effects of intracellular magnesium. *Alcohol* 1997; 14:533-536.
58. Anderson RO. Alcohol and breastfeeding. *Alcohol and breastfeeding*. *J Human Lact* 1995; 11: 321-2.
59. Church MW, Morbach CA, Subramanian MG. Comparative effects of prenatal cocaine, alcohol, and undernutrition on maternal-fetal toxicity and fetal body-composition in the sprague-dawley rat with observations on strain-dependent differences. *Neurotoxicology Teratology* 1995; 17: 559-67.
60. Detering N, Reed WD, Ozand PT, Karahasan A. The effects of maternal ethanol consumption in the rat on the development of their offspring. *J Nutr* 1979; 109: 999-1009.
61. Rawat AK. Ethanol and psychotropic drug interaction during pregnancy and lactation. *Biochem pharmacol* 1981;30:2457-60.
62. Ferrier S. Alcohol and maternal consumption. *Lancet* 1973; 2: 496.
63. Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcohol Clin Exp Res* 1982; 6: 523-31.
64. Sanchis R, Sancho-Tello M, Guerri C. The role of liquid diet formulation in the postnatal ethanol exposure of rats via mother's milk. *J Nutr* 1989; 119: 82-8.
65. Vilalpando S. Ethanol consumption during pregnancy and lactation: changes in the nutritional status of predominantly breast feeding mothers. *Arc Med Res* 1993; 24: 333-338.

66. Ba A, Seri B, Han S. Thiamine administration during chronic alcohol intake in pregnant and lactating rats: effects on the offspring neurobehavioural development. *Alcohol and Alcoholism* 1996; 31: 27-40.
67. Baer DS, Crumpacker DW. Fertility and offspring survival in mice selected for different sensitivities to alcohol. *Behav Genet* 1977; 7: 95-103.
68. Villaró S, Viñas O, Remesar X. Altered ultrastructure of lactating rat mammary epithelial cells induced by chronic ethanol ingestion. *Alcohol Clin Exper Res* 1989; 1: 128-36.
69. Tavares E, Carreras O, Gómes TA, Pagliali H, Murillo ML. Zinc intestinal absorption in newborn rats at 21 day postpartum: effects of maternal ethanol consumption. *Life Sci* 1998; 62: 787-97.
70. Tavares E, Carreras O, Gomez-Tubio A, Murillo D, Murillo ML. Effects of folic acid and amino acids supplementation on zinc intestinal absorption in the progeny of ethanol-treated rats. *J Physiol Biochem* 2000; 56: 247-56.
71. Cano MJ, Ayala A, Murillo ML, Carreras O. Protective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21-day postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period. *Free Rad Res* 2001; 34:1-8.
72. Sreeranjitkumar CV, Lal JJ, Suresh MV, Indira M, Vijayammal PL. Effect of ethanol/arrack on the lipid metabolism of mammary gland during pregnancy and lactation in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1999; 43: 332-6.
73. Tavares-do-Carmo MG, Nascimento-Curi CMO. Effects of ethanol intake on lipid metabolism in the lactating rat. *Alcohol* 1996;13: 443-8.
74. Fuseler JW. Maternal ethanol consumption induces transient compensatory hyperplasia of developing cardiac tissue in the neonatal rat. *Alcohol Alcoholism* 1993; 28: 657-66.
75. Vorherrh. Alcohol and teratogenic effects. *Post Grand Med* 1974; 56: 97.
76. Watmaman R. Alcohol in lactation. *Am J Obstet Gynec* 1972; 40:180.
77. Rawat AK. Ethanol and psychotropic drug interaction during pregnancy and lactation. *Bioch Pharm* 1981; 30: 2457-60.
78. Leonard L, Seelig Jr, William MS, Stewart GL. Second generation effects of maternal ethanol consumption on immunity to *trichinella spiralis* in female rats. *Alcohol and Alcoholism* 1999; 34: 520-528.
79. Zhu X, Seelig Jr LL. Developmental aspects of intestinal intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the rat following placental and lactational exposure to ethanol. *Alcohol and Alcoholism* 2000; 35: 25-30.
80. Thadan Lau, Stotkin, Schanberg. Effects of maternal ethanol ingestion on amine uptake into: syntoptosomes of fetal and neonatal rat brain. *J Pharmacol Exp Therap* 2000; 242-97, 1997.
81. Lalitha T, Kumar K, Ramakrishnan CV, Teland SD. Effect of maternal alcohol consumption on the lipid composition of CNS in the offspring. *J Neurochem* 1988; 50: 1346-51.
82. Vanglenova J, Petkov VV. Effect of maternal alcohol consumption on the lipid composition. *J Neurochem* 1998; 22: 697-703.
83. Daniel MA, Evans MA. Quantitative comparison of maternal ethanol and maternal tertiary butanol diet on postnatal development. *Pharm Experim Therap* 1982; 222: 294-300.
84. Minana R, Climent E, Baretino D, Segui JM, Renau-Piqueras J, Guerri C. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *J Neurochem* 2000; 75: 954-64.
85. Tarelo-Acuna L, Olvera-Cortes E, Gonzalez-Burgos I. Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. *Neurosci Lett* 2000; 286: 13-6.
86. Liston J. Breastfeeding and the use of recreational drugs - alcohol, caffeine, nicotine and marijuana. *Breastfeed Rev* 1998; 6: 27-30.
87. Gottsfeld A, LeGrue SJ. Lactational alcohol exposure elicits long-term immune deficits and increased noradrenergic synaptic transmission in lymphoid organs. *Life Sci* 1990; 47: 457-65.
88. Seelig Jr. LL, Steven WM, Stewart GL. Second generation effects of maternal ethanol consumption on immunity to *Trichinella spiralis* in female rats. *Alcohol and Alcoholism*, 1999; 34: 520-8.
89. Grossman, ER. Beer and breast feeding: the wisdom of old wines. *J Am Med Assoc* 1988; 259: 1096.
90. Na AR, Daniels LC, Seelig Jr LL. Preliminary study of how alcohol consumption during pregnancy affects immune components in breast milk and blood of postpartum women. *Alcohol-Alcohol*. 1997; 32: 581-9.
91. Zordano A, Herrera E. Decreased in vivo rate of ethanol metabolism in the suckling rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1989; 13: 527-32.
92. Silva VA, Malheiros LR, Moraes-Santos AR, Barzano MA, McLean AE. Ethanol pharmacokinetics in lactating women. *Braz J Med Biol* 1993; 26: 1097-1103.
93. Lawton ME. Alcohol in breast milk. *Aust New Zealand J Obst Gynecol* 1985; 25: 71-3.
94. Schuckit P. Minimizing alcohol exposure of the breastfeeding infant. *J Human Lact* 1995; 11: 317-9.
95. Albuquerque KT, Ramalho RA, Soares AG, Tavares-Do-Carmo MG. Effects of ethanol intake on retinol concentration in the milk of lactating rats. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 929-32.
96. Subramanian MG. Alcohol inhibits suckling-induced oxytocin release in the lactating rat. *Alcohol* 1999; 19: 51-5.
97. Tavares-do-Carmo M das G. Efeito da ingestão de álcool sobre o metabolismo lipídico em ratas lactantes. (Tese). São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1993.
98. Goodlett CR et al. A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and Purkinje cell loss. *Alcohol* 1990; 7: 107-14.
99. Neves J das, Faccin GL, Tavares-do-Carmo M da G. Efeito da ingestão de álcool durante a lactação sobre a produção e composição do LM e sobre o crescimento da prole: estudo em ratas. *R Nutr Puccamp* 1995; 8: 47-64.
100. Oyama LM, Couto RC, Couto GEC, Damaso AR, Nascimento CMO do. Ethanol intake during lactation. I. Effects on dams' metabolism and pups' body weight gain.. *Alcohol*, 2000a; 21: 195-200.

101. Abel CL. Alcohol ingestion in lactating rats: effects on mothers and offspring. *Arch Int Pharmacodyn* 1974; 210:21-127.
102. Swanberg KM, Wilson Jr. Genetic and ethanol-related differences in maternal behavior and offspring viability in mice. *Dev Psychobiol* 1979; 12 : 61-6.
103. Cheslock SJ, Varlinskaya EI, Silveri MM, Petrov ES, Spear LP, Spear NE. Acute effects of ethanol and the first suckling episode in the newborn rat. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 996-1002.
104. Klintsova AY. Therapeutic motor training increases parallel fiber synapse number Purkinje neuron in cerebellar cortex of rats given postnatal binge alcohol exposure. Preliminary report. *Alcohol: Clin Exp Res* 1997; 21: 1257-63.
105. Argote E, Argote E, Flores-Huerta S, Hernandez-Montes H, Villalpando-Hernandes S. Depuración plasmática de etanol y su excreción en la leche de mujeres rurales que consumen pulque. *Rev Invest Clin* 1992; 44: 31-6.
106. Mennella JA. Short-term effects of maternal alcohol consumption on lactational performance. *Alcoholism-Clin Experim Res* 1998; 22: 1389-92.
107. Tavares-do-Carmo MGT, Nascimento CMO do, Martin A, Herrera E. Ethanol intake during lactation impairs milk production in rats and affects growth and metabolism of suckling pups. *Alcohol* 1999;18: 71-6.
108. Heil SH, Hungund BL, Zheng ZHH, Jen KLC, Subramanian MG. Ethanol and lactation: effects on milk lipids and serum constituents. *Alcohol* 1999;18: 43-8.
109. Tavares-do-Carmo MG, Nascimento-Curi CMO. Effect of ethanol intake during lactation on the metabolism on dams and on pup development. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23: 1161-3.
110. Hungund BL. Maternal alcohol abuse and milk lipid composition. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 1996; 20:120A.
111. Oyama LM, Couto RC, Couto GEC, Damaso AR, Nascimento CMO. Ethanol intake during lactation II. Effects on pups' liver and brain metabolism. *Alcohol* 2000b; 21: 201-6.
112. Smith I. The effect of volume and duration of exposure on neonatal physical and behavioral development. *Neurobehav Toxicol Teratology* 1986; 8: 375-81.
113. Thomas JD. Behavioral deficits induced by binge-like exposure to alcohol in neonatal rats: importance of developmental timing and number of episodes. *Dev Psychobiol* 1996;29: 433-52.
114. Pepino MY, Abate P, Spear NE, Molina JC. Disruption of maternal behavior by alcohol intoxication in the lactating rat: a behavioral and metabolic analysis. *Alcohol Clin and Exp Res* v. 26, n. 8, p. 1205-1214, 2002.
115. Klintsova AY, Cowell RM, Swain RA, Napper RM, Goodlett CR, Greenough WT. Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats. I. Behavioral results. *Brain Res* 1998; 800: 48-61.
116. Lancaster FE, Phillips SM, Patsalos PN, Wiggins RC. Brain myelination in the offspring of ethanol-treated rats: in utero versus lactational exposure by crossfostering offspring of control, pairfed and ethanol treated dams. *Brain Res* 1984;309: 209-16.
117. Costa ET, Savage DD, Valenzuela CF. A review of the effects of prenatal or early postnatal ethanol exposure on brain ligand-gated ion channels. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 706-15.
118. Cheema ZF, West JR, Miranda RC. Ethanol induces FAS/APO (apoptosis-1 mRNA and cell suicide in the developing cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 535-43.
119. Green JT, Rogers RF, Goodlett CR, Steinmetz JE. Impairment in eyeblink classical conditioning in adult rats exposed to ethanol as neonates. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000; 24:438-47.
120. Subramanian MG. Evaluation of lactational parameters after alcohol administration for four days during early or midlactation in the rat. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1997; 21: 799-803.
121. Subramanian MG. Inhibitory effect of alcohol on the established suckling-induced prolactin surge in lactating rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1991; 198: 579.
122. Subramanian MG. Beta-endorphin-stimulated prolactin-release in lactating rats following alcohol administration. *Alcohol* 1994; 11: 269-72.
123. Subramanian MG, Savoy Moore RT. Alcohol effects on TRH-induced prolactin response in lactating rats - in vivo and in vitro studies. *Alcohol*, 1993; 10: 11-5.
124. Subramanian MG, Heil SH. Chronic alcohol exposure and lactation - extended observations. *Alcohol* 2000; 21: 127-32.
125. Koletzko B, Lehner F. Beer and breastfeeding. *Adv Exp Med Biol* 2000; 478: 23-8.
126. De Rosa G, Coserillo, RMP, Della Casa S, Pasargilian E. Prolactin secretion after beer. *Lancet* 1981; 2: 934.
127. Juarez J, Barrios TE, Vazquez C. Alcohol treatment during lactation produces and advances in the onset of puberty in female rats. *Alcohol* 2000; 21:181-5.
128. Tran TD, Kelly SJ. Alterations in hippocampal and hypothalamic monoaminergic neurotransmitter systems after alcohol exposure during all three trimester equivalents in adult rats. *J Neural Transm* 1999;106: 773-86.
129. Rovinski B, Hosein EA. Chronic maternal ethanol administration in the rat decreases the stimulation by (-) epinephrine of glycogen phosphorylase a in the livers of the progeny during development. *Subst Alcohol Actions Misuse* 1984; 5: 77-85.
130. Huttunen P, Kortelainen ML, Hirvonen J. Foetal and lactational exposure to alcohol increases oxidative capacity of brown adipose tissue in the rat. A possible relationship to death. *Br J Exp Pathol* 1989;70:691-5.
131. Fuchs AR, Wagner G. The ethanol of ethyl alcohol on the release of oxytocin in rabbits. *Acta Endocrinol* 1963;44:593-605.
132. Fuchs AR. Ethanol and the inhibition of oxytocin release in lactating rats. *Acta Endocrinol* 1969;546-54.
133. Lincoln DW. Milk ejection during alcohol anaesthesia in the rat. *Nature* 1973;243:222-9.
134. Coiro V. Inhibition by ethanol of the oxytocin response to breast stimulation in normal women and the role of endogenous opioids. *Acta Endocrinol* 1992;126:213-16.

Recibido: 14-10-2002

Aceptado: 27-11-2003

Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca

José Serrano e Isabel Goñi

Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España

RESUMEN. En Guatemala existe un fenómeno de superposición epidemiológica, en el que coexisten problemas de salud propios de países desarrollados con otros característicos de poblaciones en vías de desarrollo. Se observan deficiencias marcadas en algunos macronutrientes tales como hierro y vitamina A, en simultaneidad con enfermedades crónicas como diabetes tipo II o enfermedades cardiovasculares. Se conoce muy bien la importancia del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) en la dieta habitual de Guatemala, en donde el consumo *per capita* es de 70g al día. Además del aporte energético, los frijoles constituyen la principal fuente de proteína en la dieta y contienen un alto porcentaje de carbohidratos glicémicos de digestión lenta y carbohidratos no glicémicos fermentables en el intestino grueso. Estos últimos, pueden ejercer efectos fisiológicos beneficiosos relacionados con el control de la respuesta glicémica, de los niveles de colesterol sanguíneo y disminución de los factores de riesgo de cáncer colónico debido a la formación de productos de fermentación colónica (propiónico y butírico). Sin embargo, el frijol negro contiene también diversos factores antinutricionales (inhibidores enzimáticos, hemaglutininas, saponinas, ácido fítico, etc.) muchos de ellos termolábiles que pueden ser destruidos durante el procesado. La riqueza nutricional del frijol negro, y especialmente los carbohidratos glicémicos de digestión lenta, los compuestos no digeribles fermentados por las bacterias intestinales y algunos factores antinutricionales, juegan un papel importante en la etiología de numerosas enfermedades de incidencia actual en Guatemala.

Palabras clave: Frijol negro, estado nutricional, carbohidratos glicémicos, carbohidratos no glicémicos, fibra dietética, proteína, compuestos antinutricionales.

SUMMARY. Effects of black bean *Phaseolus vulgaris* consumption on the nutritional status of Guatemalan population. Guatemala provides an example of epidemiological superposition, in which health problems typical of developed countries and developing countries are both observed. Nutritional deficiencies in some micronutrients like vitamin A and iron coexist alongside chronic diseases such as diabetes type II and cardiovascular diseases. The importance of black beans in the normal Guatemala diet is well known: 70g per capita of black beans are consumed daily. Black beans are an important sources of protein and energy in the diet. They contain "lente" digestion carbohydrates and a high proportion of non-digested carbohydrates that may be fermented in the large intestine. These types of carbohydrates are associated with a low glycemic response, low serum cholesterol levels, and a decrease of colon cancer risk factors. These physiological effects may be related to colonic fermentation end products (propionic and butyric acids). Black beans also contain several antinutritional compounds (enzymatic inhibitors, haemagglutinins, saponins and phytic acid, etc.), some of them thermolabiles that are partially eliminated during culinary processes and may modify the nutritional quality of beans. Black beans play a crucial role in the etiology of several diseases in Guatemala.

Key words: Black beans, nutritional status, glycemic carbohydrates, non glycemic carbohydrates, dietary fibre, protein, antinutritional factors.

INTRODUCCION

Los hábitos alimentarios están vinculados fuertemente a la tradición y a la cultura en Guatemala. La urbanización y modernización, así como la crisis económica y social han traído consigo cambios en el patrón de consumo de alimentos. En el sector rural, la dieta depende del autoabastecimiento de un número limitado de alimentos, mientras que en el sector urbano, el consumo es más dependiente de la disponibilidad económica y de la cadena de distribución de alimentos.

Un porcentaje importante de la población de Guatemala presenta deficiencias nutricionales debido a la escasa

disponibilidad de alimentos y al deficiente consumo de nutrientes. En 1994 la tasa de mortalidad por desnutrición en el ámbito nacional era de 45 por 100.000 habitantes. El 69,5% de la población de niños menores de 6 años presentaban desnutrición crónica y 14% desnutrición aguda. Estos valores se incrementan significativamente (83,5%) cuando se considera la población infantil menores de 9 años (1).

Por otra parte, se ha elevado la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles, tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares y algunos tipo de cáncer, asociados al consumo excesivo de algunos alimentos o de dietas no

equilibradas. Esta tendencia se asocia a un aumento en la incidencia de sobrepeso y obesidad en la población adulta, especialmente femenina en donde 11,30% de las mujeres muestran un peso por encima de su peso óptimo. Las enfermedades cardiovasculares constituyen el 6.68% del total de las causas de muerte, de los cuales 22.76% son consecuencia de accidentes cerebrovasculares. Con relación al cáncer, durante 1994 en Guatemala se registraron un 3,6% de defunciones por tumores malignos, siendo los cánceres más frecuentes de origen gástrico (36%), hepatobiliar (36%) y broncopulmonar (10,5%) (1).

Esta situación, que constituye una fase del proceso de transición epidemiológica nutricional que caracteriza a la región, está siendo cada vez más manifiesta en la población urbano marginal, en especial en el grupo de urbanización reciente. En esa población coexisten deficiencias nutricionales con sobrealimentación. Son frecuentes las familias en las que conviven niños con alto riesgo de desnutrición proteínico-energética y padres con sobrepeso u obesidad, constituyendo ambas situaciones expresiones de malnutrición y pobreza. Esta situación se ha definido como polarización alimentaria-nutricional (2).

Los frijoles juegan un papel importante en la dieta del guatemalteco no solo por su contenido energético, sino por la gran cantidad de proteína que suministran. Según la Encuesta Nacional de Consumo aparente de alimentos, se consumen 49.25g al día, lo cual contribuye con 197 Kcal a la ingesta energética diaria (3). La totalidad de las familias guatemaltecas consumen frijol negro en las tres comidas principales del día, con una frecuencia de consumo de 78.0%, 77.8% y 97.1% en el desayuno, almuerzo y cena respectivamente (4).

El consumo de frijol resulta especialmente valioso como complemento de los cereales en aquellas regiones donde la población tienen limitado el acceso a la proteína de productos animales. El frijol también contienen factores antinutricionales tales como inhibidores de tripsina, hemaglutininas, saponinas y ácido fitico entre otros. Muchos de los cuales son destruidos, al menos en parte, durante los tratamientos culinarios. Estos factores modifican el aprovechamiento nutricional de sus componentes.

Ingesta de alimentos, patrón dietético y estado nutricional

En Guatemala existen diferencias en el consumo de alimentos entre las poblaciones rurales y urbanas. El consumo de alimentos de origen animal (lácteos, huevos y carnes) en el área urbana, es más del doble de las cantidades consumidas en el área rural. Además, en el área urbana, la mayor parte de las familias consumen una dieta variada, mientras que en el área rural la dieta está basada principalmente en maíz, verduras y frijol. La Tabla 1 presenta información sobre el consumo familiar de alimentos en Guatemala.

TABLA 1
Consumo de alimentos por adulto equivalente^o y por día, en familias urbanas y rurales de Guatemala, 1987 (5)

	Area urbana		Area rural	
	Media (g)	Familias consumidoras (%)	Media (g)	Familias consumidoras (%)
Lácteos	71.1	68.0*	20.5	16.7
Huevos	51.3	69.0*	22.1	37.0
Carnes	95.6	62.0*	43.7	35.1
Frijol	80.9	83.5*	59.9	58.5
Otras leguminosas	0.5	3.0	4.9	5.4
Verduras	119.5	98.0	163.2	96.4
Frutas	78.8	68.5*	17.0	17.2
Musáceas	61.3	39.5*	9.2	5.4
Raíces y tubérculos	43.6	25.0	88.2	33.7
Arroz	25.1	40.0*	14.7	22.5
Maíz	74.2	31.0*	645.6	97.4
Derivados del maíz	200.9	82.0*	14.6	5.2
Otros cereales	25.2	71.5*	9.4	24.8
Pan	121.1	94.0*	9.1	13.1
Azúcar	84.8	100.0	61.4	96.7
Aceites y grasas	18.9	92.0*	4.3	54.3

^o Diferencia significativa entre zona rural y urbana (P<0.05)

* Adulto equivalente: Consumo per cápita expresado en proporción a las recomendaciones de un adulto típico de 60 kg.

El consumo de frijol es mayor en el medio urbano (81g) que en el rural (60g). Esto se explica en parte, porque en muchas comunidades del altiplano no es posible cultivar el frijol por limitaciones ecológicas. Además, la disponibilidad de alimentos para la venta es menor que el área urbana (5). La tortilla de maíz y los frijoles son los alimentos de mayor consumo en niños pre-escolares y por lo tanto son las principales fuentes de calorías, hierro y proteínas (6).

La contribución de cada alimento al consumo total de energía y proteína en las áreas rural y urbana de Guatemala, se indican en la Tabla 2. Aproximadamente el 70% de las calorías totales ingeridas por un campesino adulto promedio, provienen del consumo de maíz, mientras que en el área urbana el consumo de este alimento sólo aporta el 27% del total calórico, mientras que el pan de trigo, frijol y azúcar aportan el 41% de las calorías totales. En relación con las proteínas, la tendencia es parecida. En las familias campesinas, el maíz y el frijol aportan casi el 70% de proteínas. Sin embargo, en el sector urbano, los alimentos de origen animal aportan más del 30% de las proteínas, siguiéndole el frijol con 25% y el maíz con el 21%.

TABLA 2
Aporte de energía y proteínas por Grupos de Alimentos en el área urbana y rural de Guatemala (5)

	Energía (%)		Proteínas (%)	
	Area urbana	Area rural	Area urbana	Area rural
Lácteos	4.3	0.7	7.6	2.0
Huevos	2.7	1.0	6.1	2.5
Carnes	4.3	2.7	16.5	11.7
Frijol	11.9	6.1	24.8	14.2
Otras leguminosas	0.1	0.3	0.1	0.7
Verduras	11.3	2.4	1.6	4.2
Frutas	1.2	0.3	0.4	0.1
Musáceas	1.6	0.3	0.5	0.1
Raíces y tubérculos	0.8	2.7	0.6	2.5
Maíz y derivados	27.2	69.8	21.6	57.5
Cereales y pasta	7.9	1.1	6.8	2.6
Pan	16.9	7.7	11.7	0.6
Azúcar	12.5	1.1	-	-
Aceites y grasas	5.7	1.1	-	-
Ingesta por adulto	2637.5	3194.3	82.9	87.8

La ingesta media nacional de energía se ajusta a las recomendaciones dietéticas. El consumo promedio del adulto en el sector urbano es de 2.638 kcal/día y representa el 101.5% de la recomendaciones calóricas medias para un adulto con actividad moderada. En el sector rural, la ingesta media del adulto es de 3.194,3 kcal/día y equivale al 107,3% del valor medio recomendado para un adulto en condiciones de actividad física intensa (5). La ingesta de energía y proteína de la población infantil presenta grandes fluctuaciones (energía: entre 105 y 4815 cal/día; proteína : entre 1 y 167 g/día). Aunque los valores medios (918 kcal/día y 28g de proteína/día) se adecuan a las recomendaciones dietéticas de la mayor parte de la población infantil (6), hay que tener en cuenta que un alto porcentaje de niños ingiere cantidades de proteínas y calorías por debajo de los valores necesarios para conseguir y mantener un estado de salud óptimo. Por la misma razón, hay que suponer que una parte de la población consume un exceso, que en el caso de las calorías se convierte en un factor de riesgo de patologías.

Composición proximal del frijol negro

El frijol negro tienen un contenido elevado de proteína, carbohidratos y minerales, poco contenido en lípidos, aunque es rico en ácido linoléico (7) y su aporte calórico es relativamente bajo.

La composición del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) y el aporte de micronutrientes a los requerimientos diarios de vitaminas y minerales por ración promedio de frijol (70.5g)

consumida en Guatemala, se muestra en la Tabla 3. Como puede observarse, el frijol aporta el 134.4%, 19.1% y 15.9% de las cantidades diarias recomendadas de ácido fólico, hierro y zinc respectivamente, nutrientes que generalmente se encuentran deficientes en la población guatemalteca.

TABLA 3
Composición nutricional del frijol negro crudo. Aporte de la ración diaria (70,5g) a las cantidades diarias recomendadas (CRD) de nutrientes para Guatemala (7)

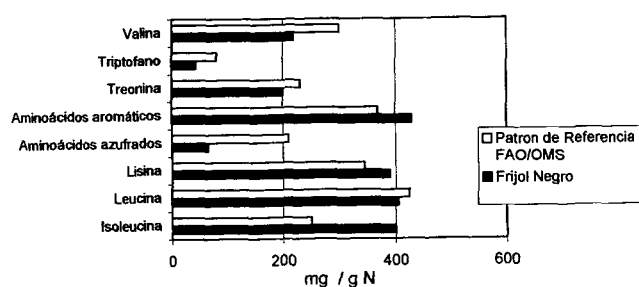
		Contribución de la ración diaria de frijol a las CRD (%)
Energía	345 kcal	8.34
Humedad	10.6g	
Proteína	21.8 g	25.4
Grasa	14 g	-
Carbohidratos	63.5 g	-
Tiamina	0.99 mg	40.4
Riboflavina	0.201 mg	7,5
Niacina	1.93 mg	4.9
Vitamina B6	0.285 mg	8.8
Acido fólico	0.447 mg	134.4
Fósforo	380.3 mg	28.4
Potasio	1424.3 mg	34.6
Sodio	5.2 mg	0.3
Calcio	92.3 mg	5.6
Magnesio	195.6 mg	35.5
Zinc	3.96 mg	15.9
Cobre	0.77 mg	27.5
Hierro	4.82 mg	19.1

Composición de proteínas

El frijol negro es una de las principales fuentes de proteínas en la dieta del guatemalteco (Tabla 2). La comparación del contenido en aminoácidos de la proteína del frijol con la proteína de referencia de FAO/OMS, indica que el frijol negro es una buena fuente de aminoácidos aromáticos, lisina leucina e isoleucina. Sin embargo, es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), valina, triptofano y treonina (Figura 1), (8) en comparación con el patrón de referencia FAO/OMS. Tal y como se ha indicado, los frijoles se consumen habitualmente con tortillas de maíz (ración diaria: 30g de frijol con 100g de maíz) (9), lo que supone una complementación de ambas proteínas, originando una proteína de alto valor nutricional. Sin embargo, su utilización biológica se ve afectada por la presencia de factores inhibidores de su absorción, tales como taninos y ácidos fitico (8). Por otro lado, la mayor parte de estos inhibidores son termolábiles, por lo que su capacidad inhibitoria se reduce significativamente con los procesos

térmicos culinarios. El tratamiento térmico tiene un doble efecto sobre las leguminosas. Por otra parte, disminuye y elimina la actividad de algunos factores antifisiológicos, mientras que por otro lado, aumenta la disponibilidad de aminoácidos azufrados presentes en altas concentraciones en los inhibidores de tripsina.

FIGURA 1
Contenido de aminoácidos esenciales del frijol cocido



La digestibilidad aparente de la proteína en los frijoles negros cocidos es de 68.8%. La valina es el aminoácido menos biodisponible (9), mientras que la lisina es el más biodisponible (promedio de 84.6%) (9). No obstante, el tratamiento térmico excesivo puede disminuir la disponibilidad de algunos aminoácidos, en particular la lisina (10), lo cual tiene interés sanitario, ya que el contenido en lisina de la dieta puede ser determinante en su aterogenicidad (11) y explicar, al menos en parte por que los bajos contenidos en lisina de las proteínas vegetales disminuyen el colesterol plasmático. Kritchewsky (12) indica que cuanto menor es el cociente lisina/arginina, menor es la incidencia de hipercolesterolemia y aterosclerosis. Este cociente para el frijol negro es de 1.23, mientras que para la caseína es de 1.90 (11).

Composición de carbohidratos

Los carbohidratos son los componentes mayoritarios del frijol negro (7). La mayor parte son carbohidratos complejos, almidón y fibra dietética, mientras que la fracción de azúcares (mono, di y oligosacáridos) es significativamente menor (13). Debido a las aplicaciones en la salud, se comentará el contenido de carbohidratos de los frijoles, teniendo en cuenta su naturaleza de glicémicos y no glicémicos, según la clasificación establecida por FAO/OMS (14) como se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4
Caracterización de carbohidratos de frijol negro cocido

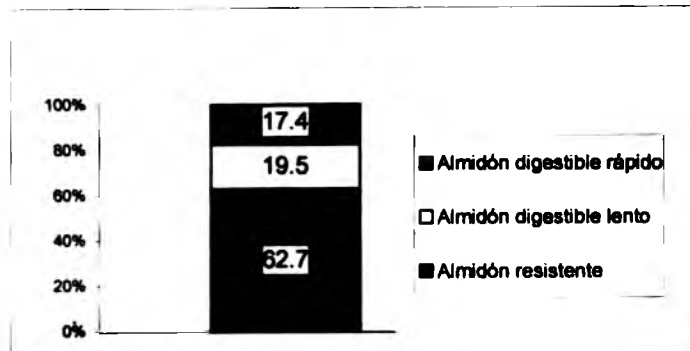
	(% materia seca)	Referencia
Carbohidratos glicémicos		
Glucosa libre	0.1	(23)
Almidón total	42.9	(23)
Almidón rápidamente digerible	7.5	(23)
Almidón lentamente digerible	8.4	(23)
Índice glicémico (pan blanco como referencia)	28	(15)
Carbohidratos no glicémicos		
Fibra dietética total	27.0	(25)
Fibra soluble	4.5	(25)
Fibra insoluble	22.6	(25)
Almidón resistente	26.9	(23)
Oligosacáridos no digeribles		
Rafinosa	0.40	(52)
Estaquiosa	3.23	(52)
Verbascosa	0.12	(52)

Carbohidratos glicémicos

Los carbohidratos glicémicos son digeridos y absorbidos en el intestino delgado y por lo tanto, modifican los niveles de glucemia del consumidor. Entre los carbohidratos glicémicos se pueden mencionar el almidón, di- y oligosacáridos digeribles y glucosa libre. El contenido en almidón total es relativamente alto, 42.9%, sin embargo, la mayor parte del mismo (62.7%) es almidón resistente a la digestión por la α -amilasa pancreática, lo que supone que tan solo el 37.3% del total del almidón disponible puede repercutir directamente en la respuesta glucémica. Además, más que la mitad de este valor corresponde a carbohidratos de digestión lenta (Figura 2). Estos datos se reflejan en los bajos valores de índice glucémico observados habitualmente en los frijoles (IG: 20 y 28 respecto a glucosa y pan respectivamente) (15).

Los mecanismos que determinan este comportamiento están relacionados tanto con las características del propio almidón (origen botánico, proporción de amilosa/amilopectina, etc) como con la estructura del cotiledón y asociaciones entre las células constituyentes (13). Por otro lado, el bajo IG también puede ser atribuido a la presencia de fitohemagluteninas, que actúan como inhibidores de la maltasa y amilasa intestinal disminuyendo el transporte y la absorción de glucosa en el lumen (16). Además, los taninos presentes en los frijoles pueden tener actividad anti-amilasa (17), dificultando la digestión de los carbohidratos glicémicos e incrementando el porcentaje de carbohidratos resistentes a la digestión.

FIGURA 2
Distribución porcentual de las fracciones de almidón en
frijoles negros cocidos



Uno de los objetivos nutricionales propuestos por el Comité de Expertos de FAO/OMS (14) es conseguir que la población consuma alimentos de bajo índice glucémico (IG), ya que se relacionan con una menor incidencia de factores de riesgo de enfermedades cuyo tratamiento requiera el control de la respuesta glucémica. Los alimentos con bajo IG favorecen el control de la glucemia, disminuyen los requerimientos de insulina y disminuyen los niveles de fructosaminas y triglicéridos plasmáticos (18). Una disminución del 10% en el IG de la dieta, aumenta la sensibilidad de la insulina en un 30% y reduce los niveles post-prandiales de ácidos grasos no esterificados, afectando la síntesis hepática de VLDL. Una meta-análisis de 11 estudios (19) indica que una dieta de bajo IG reduce (16%) los niveles medios de glucemia, disminuye (20%) la concentración urinaria de péptido C, disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada (9%) y de colesterol total y triglicéridos (6% y 9% respectivamente). También se ha observado que este tipo de dietas mejora la actividad fibrinolítica (20) y contribuye a la normalización de la respuesta insulínica en sujetos hiperinsulinémicos (21).

Carbohidratos no glicémicos

Los carbohidratos no glicémicos resisten la acción de la α -amilasas digestivas y alcanzan el intestino grueso donde pueden ser fermentados por las bacterias colónicas. Estos carbohidratos no afectan directamente la respuesta glicémica, pero repercuten en diferentes aspectos debido a su capacidad para modular la composición de la microbiota colónica y a los efectos fisiológicos de los productos finales de la fermentación anaerobia (22).

Los frijoles contienen varios componentes hidrocarbonados no glicémicos: almidón resistente, polisacáridos de la fracción de fibra dietética y oligosacáridos

no digeribles (Tabla 4). El conjunto representa el 57.65% de la materia seca del alimento cocinado, siendo la cáscara la de mayor contenido de polisacáridos celulósicos estructurales y lignina, los cuales van desde un 58.7% a 65% y 1.4% a 1.9% respectivamente (53). La mayor parte de la fibra es degradada por la microbiota (23). Durante el proceso de fermentación se genera ATP, se originan ácidos grasos de cadena corta (AGCC), se generan gases y se incrementa la proliferación de las propias bacterias cuya población puede ser modulada con el tipo y cantidad de sustratos indigestibles presentes en el ecosistema intestinal (oligosacáridos no digeribles, almidón resistente y componentes hidrocarbonados de la fibra dietética) (22).

En el residuo ileal se han cuantificado 3 fracciones de almidón resistente con diferente grado de polimerización. La fracción mayoritaria (75% del total de α -glucanos) está formada por polímeros de $n=40$. Los compuestos con un grado de polimerización mayor ($n>400$), constituyen el 15% del total y la tercera fracción (10%) está formada por polímeros entre 1 y 8 unidades. Por otro lado, las leguminosas son ricas en amilosa, lo que incrementa la posibilidad de retrogradación durante la cocción (24). Sin embargo, el almidón retrogrado no explica la cantidad de α -glucanos indigeribles presentes en el residuo ileal, por lo que se supone que este residuo corresponde al almidón nativo junto con fracciones retrogradadas (24).

Según se indica en la Tabla 4, el frijol negro cocido contienen un 4.5% y 22.6% de fibra dietética soluble e insoluble respectivamente (25). En la fracción de fibra están incluidos los componentes propios de la fibra (polisacáridos no amiláceos y lignina) y otros compuestos asociados de naturaleza no hidrocarbonada tales como taninos, proteína y fitatos. Todos estos componentes, junto con almidón resistente, oligosacáridos no digeribles y otros componentes de los frijoles no digeridos en el intestino delgado, constituyen la fracción indigestible del alimento, los cuales pueden ser fermentados por la microflora colónica (26), originándose ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Según Bednar y col. (23) cada grano de materia orgánica de frijol produce 7.24 mmol de AGCC con un perfil de fermentación Acético: Propiónico: Butírico de 71:12:17. Los AGCC ejercen efectos fisiológicos sistémicos y locales que repercuten sobre el metabolismo lipídico y colónico (22). El ácido propiónico se relaciona con la disminución de colesterol plasmático debido a la inhibición de la colesterologénesis. El ácido butírico es el principal sustrato energético para los colonocitos y se ha demostrado que induce apoptosis, inhibe el crecimiento (27) y diferenciación de células colónicas tumorales (28). Cada componente indigestible puede tener un comportamiento fisiológico propio, ya que los efectos en el organismo son consecuencia de la triple interacción entre sustratos, microbiota y medio

intestinal. En líneas generales, la fracción soluble de la fracción indigestible (complejo fibra, oligosacáridos y almidón resistente) es altamente fermentable. Mientras que los componentes de la fracción insoluble son más resistentes a la degradación bacteriana y pueden tener un efecto más marcado en el tránsito intestinal de consumidor.

El consumo de frijol como fuente de fibra, produce una mayor saciedad, debido a varias causas: mayor volumen de alimentos, mayor tiempo de ingestión, lo que produce una mayor sensación de plenitud intestinal, niveles elevados de colecistocinina, relacionado con reducciones en los niveles de plasmáticos de glucosa e insulina en pacientes diabéticos (29).

Mucho de los efectos del consumo de frijoles en las lipoproteínas han sido atribuidos a su contenido en fibra dietética. El consumo de frijol puede alterar la excreción de sales biliares y esteroides, disminuir el coeficiente de digestibilidad de grasas (30), aumentar los niveles de colecistocina y aumentar la producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación (31).

El consumo diario de frijoles disminuye la concentración de colesterol sérico (32). El efecto cardioprotector parece estar relacionado en orden de importancia con los siguientes factores: contenido y tipo de fibra soluble (33), proporción y cantidad de aminoácidos (34), cantidad de oligosacáridos no digestibles (35), isoflavonas (36), fosfolípidos y ácidos grasos (37), fitoesteroides (38), saponinas (30) y otros factores aún desconocidos (39).

Composición en grasas

Aunque el contenido en grasa del frijol es bajo (14%), tiene un alto porcentaje de fosfolípidos (25-35% del contenido total de grasa), que han demostrado tener un potente efecto hipolipemiante, incluso a bajas concentraciones (37). El ácido linoléico es el ácido graso más abundante (7). En este sentido, la Asociación Americana del Corazón recomienda que para disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares se debe limitar la ingesta de ácidos grasos saturados y ácidos grasos trans, ya que así se reducen las concentraciones de LDL colesterol (40).

Composición en micronutrientes

El consumo de frijol negro en la población de Guatemala aporta el 15.9%, 19.1% y 134.4% de las cantidades de ingesta recomendadas de zinc, hierro y ácido fólico respectivamente (Tabla 3). El contenido en hierro es alto (4.82%), aunque tiene una biodisponibilidad muy baja (0.8%), posiblemente debido a la presencia de otros componentes no nutritivos presentes en los frijoles. Especial mención merece el fósforo, puesto que un alto porcentaje del mismo (50%) se encuentra formando fitatos que no son biodisponibles en el intestino (41).

Los frijoles negros tienen un alto contenido en ácido fólico y tiamina, vitaminas que reducen los niveles de homocisteína sérica. Esta es una razón más por la que el consumo de frijol negro puede reducir este riesgo de enfermedad cardiovascular.

Composición de factores antinutricionales

Entre los compuestos no nutritivos de los frijoles se pueden mencionar los inhibidores de enzimas (tripsina y α -amilasa), fitatos, oxalatos, compuestos fenólicos y saponinas entre otras. Muchos de ellos se han identificado debido a los efectos adversos que producen, sin embargo, últimamente se cree que a dosis controladas podrían ejercer efectos benéficos en la salud y en este sentido muchos autores los clasifican como compuestos bioactivos. Los inhibidores de proteasas han sido asociados con cáncer pancreático en estudios con animales, aunque se ha observado que pueden actuar como agentes anticancerígenos (42). Estudios con animales, cultivos celulares *in vitro* y datos epidemiológicos, muestran bajas tasas de mortalidad por cáncer en poblaciones humanas con alta ingesta de inhibidores de proteasas. Se ha observado *in vitro*, que los inhibidores de proteasa pueden suprimir la transformación maligna de células inducidas por diferentes tipos de agentes cancerígenos (43).

Con relación a los inhibidores de amilasa, se ha observado que pueden causar hipertrofia pancreática (44). Sin embargo, también se ha comprobado que pueden reducir la digestibilidad de almidón, y por lo tanto reducir los niveles de glucosa sanguínea y aumentar los niveles de insulina en personas, ratas, perros (45). El consumo de frijol, reduce los niveles glucosa plasmática post-prandial, insulina, péptido C y péptido inhibidor gástrico, lo que sugiere que podría ser utilizado con propósitos terapéuticos en diabetes y control de obesidad (46).

La fitohemagluteninas son proteínas termolábiles resistentes a la hidrólisis enzimática que tienen capacidad para unirse a carbohidratos. El consumo de fitohemagluteninas se asocia a toxicidad, debido a su efecto aglutinante de glóbulos rojos. Sin embargo, se ha observado que las fitohemagluteninas pueden influenciar la glicemia por uniones en las células de la mucosa intestinal, en donde causan una disminución en la absorción de nutrientes. El conjunto formado por fitohemagluteninas y carbohidratos, pueden actuar como hormonas metabólicas por uniones a carbohidratos específicos en receptores de membrana. A través de estas uniones, actuarían como potentes factores exógenos del crecimiento en el intestino y en consecuencia inducirían una intensa proliferación celular y cambios en el metabolismo de las células epiteliales. El aumento en la proliferación de las células epiteliales intestinales altera la expresión de genes, para lo cual se requieren grandes cantidades de poliaminas, las cuales son segundos mensajeros de las síntesis de DNA, RNA y proteínas y por lo tanto

esenciales para el crecimiento y la proliferación celular (47). En consecuencia, uno de los primeros efectos de la fitohemagluteninas es incrementar la captación, a través de la membrana basolateral, de poliaminas procedentes de circulación sistémica, en proporciones suficientes para mantener el crecimiento del tejido y debido a que los tumores requieren un suministro incrementado de poliaminas, puede establecerse un proceso de competencia con tejidos normales, que sean estimulados reversiblemente a proliferar con fitohemagluteninas (47). En este sentido, estudios con modelos de animales (ratas y ratones) han mostrado que las fitohemagluteninas de *Phaseolus vulgaris* limitan el crecimiento de tumores no digestivos por medio de una promoción de la hiperplasia del epitelio intestinal (48).

El ácido fítico debido a su alta reactividad con cationes especialmente con zinc, calcio y hierro, forma complejos insolubles que hacen disminuir la biodisponibilidad de estos minerales en el intestino (49). Sin embargo, la habilidad del ácido fítico para quelar minerales, también puede ejercer efectos protectores relacionados con el riesgo de cáncer de colon (50) y la disminución en el colesterol y triglicéridos séricos en animales experimentales (50). Su mecanismo de acción, parece estar relacionado con su poder antioxidante, que reduce la proliferación celular y aumenta la respuesta inmune (50).

Los taninos condensados han sido asociados a la baja disponibilidad de la proteína como se menciona en el apartado de la proteína. Aunque muchos autores los asocian como factores antinutricionales debido a sus efectos adversos en las enzimas digestivas, se considera que las propiedades antioxidantes que presentan pueden tener efectos benéficos en la salud.

Otros factores antinutricionales presentes en el frijol tales como cianógenos, saponinas y varios factores antivitaminas, están presentes en el frijol negro y ejercen efectos adversos en el consumidor.

Hábitos culinarios. Efecto del procesamiento culinario en la calidad nutritiva del frijol

En alimentación humana, las leguminosas se someten a una serie de procesos tecnológicos y/o culinarios que mejoran su valor nutricional. Un buen procesado es probablemente más importante en las legumbres que en cualquier otro alimento, debido a la posibilidad de eliminar componentes no deseables presentes en estos alimentos crudos, tal y como se ha mencionado en el apartado anterior. Además, se mejora la palatabilidad y se aumenta la disponibilidad de ciertos nutrientes presentes en su composición, por medio de una disminución en factores antinutricionales como fitatos y taninos (52). Los métodos de preparación varían notablemente en función de los pueblos y las culturas. La población guatemalteca consume preferentemente frijoles cosechados

recientemente. Pocas familias (7%) remojan el frijol durante la noche previa a la cocción. La mayor parte, 65.9% de las familias, sumerge los frijoles en agua fría y el resto calienta primero el agua y sumerge los frijoles en el agua hirviendo. El tiempo de cocción varía entre 25 y 240 minutos dependiendo de la altitud y de la temperatura ambiental (4).

Después de la cocción, se consume tanto el grano entero como el caldo, que es consumido por todos los miembros de la familia tres veces al día (4). Es de destacar la importancia de este caldo para la alimentación de los niños, puesto que para muchos de ellos es el primer alimento que toman después de la lactancia materna y antes de que puedan masticar.

El remojo previo a la cocción, que se realiza a temperatura ambiente, ablanda el grano, reduce el tiempo de cocción y reduce la concentración de algunas sustancias no nutritivas que se solubilizan en el medio, tales como ácido fítico, taninos, polifenoles etc. (41). Por otro lado, este proceso culinario aumenta las actividades tripsina y α -amilasa como consecuencia de un aumento en la permeabilidad en la pared de las semillas, ya que los inhibidores de estas actividades enzimáticas son solubles en agua (41) y salen de la semilla, solubilizándose en el agua de remojo. También se solubilizan minerales, por lo que en parte disminuye el aporte nutricional de micronutrientes.

El proceso de cocción mejora la textura y palatabilidad del alimento e incrementa la utilización digestiva de sus componentes. Cuando los frijoles están en contacto con agua caliente o fría, puede existir cierta lixiviación (especialmente de los nutrientes solubles en agua) de vitaminas y minerales de las leguminosas hacia el agua. El análisis proximal del caldo de frijol contiene en promedio 6.96-10.65% de carbohidratos y 1.2 a 2.1% de proteína (4).

El calor destruye algunos compuestos termolábiles tales como inhibidores de proteasas, hemagluteninas, etc., desnaturaliza proteínas e incluso produce un cierto grado de hidrólisis, todo lo cual conduce a una predigestión proteica que facilita la digestión posterior del alimento. Ahora bien, un tratamiento térmico prolongado hace disminuir el valor nutritivo de la proteína, ya que destruye aminoácidos esenciales como lisina y cistina. En muchas zonas de Guatemala es habitual mantener en caliente los frijoles cocidos durante todo el día, lo que disminuye la calidad de la proteína disponible. Las diferencias en el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en frijoles negros en diferentes tratamientos culinarios se muestra en la Tabla 5. Llama la atención que la cocción con olla de presión aumenta su contenido de fibra dietética soluble en 0.76 g en comparación con su valor equivalente en 100 g de leguminosa cruda (51). El efecto del procesamiento con relación al contenido de fibra puede ser debido a la presencia de sustancias amiláceas en el grano, que al enfriarse retrograda parte del almidón y este se cuantifica como fibra dietética.

TABLA
Promedio y variabilidad en el contenido de fibra dietética total, insoluble y soluble en frijoles negros crudos y sometidos a tratamiento térmico (51)

Fracción fibra	Tratamiento	Contenido (%)
Fibra dietética total	Crudo	24.31
	Hervor prolongado	21.24
	Olla de presión	25.63
Fibra dietética soluble	Crudo	1.38
	Hervor prolongado	1.13
	Olla de presión	2.14
Fibra dietética insoluble	Crudo	23.07
	Hervor prolongado	20.10
	Olla de presión	23.48

CONCLUSIONES

El frijol negro es uno de los principales alimentos en la alimentación guatemalteca por su aporte energético y contenido en proteínas y carbohidratos. Es un alimento básico en la dieta de las familias de estratos socioeconómicos bajos, en donde se complementa con cereales como el maíz y constituye una buena fuente de aminoácidos esenciales. Es importante el contenido en componentes antinutricionales, muchos de los cuales pueden tener connotaciones beneficiosas para la salud, puesto que actualmente pueden ser considerados compuestos bioactivos e integrantes de la denominada fracción indigestible de los alimentos. La escasa información que existe al respecto, hace prever que estos constituyentes se relacionen con efectos antioxidantes y protectores de la salud gastrointestinal. Sería interesante estudiar el riesgo-beneficio de la incorporación o eliminación de algunos de estos compuestos en la dieta, con el fin de impactar positivamente en la salud de la población guatemalteca.

REFERENCIAS

- Organización Panamericana de la Salud (OPS). La Salud de las Américas. Volumen II. 1998.
- Delgado H. La Seguridad Alimentaria y Nutricional en Centroamérica. Situación actual. INCAP. PP/NT/001. 2001.
- SEGEPLAN. Encuesta Nacional de Consumo Aparente de Alimentos. Guatemala. 1991.
- Bressani R, Navarreto D, Garcia-Soto A, Elias L. Culinary practices and consumption characteristics of common beans at the rural home level. Arch Latinoamer Nutr 1988;38(4):925-934.
- Alarcón J, Andriano F. Diferencias urbano-rurales en la ingesta de alimentos de familias pobres de Guatemala. Arch Latinoamer Nutr 1991;39(3):327-335.
- Gamero H, Arita M, Bulux J, Solomons N. Patrón dietético e ingesta de nutrientes de niños pre-escolares de tres aldeas rurales del departamento de Santa Rosa, Guatemala. Arch Latinoamer Nutr 1996;46(1):22-26.
- Matthews R. Legumes. Chemistry, Technology and Nutrition. Marcell Dekker, Inc USA. 389pp. 1989.
- Blanco A, Bressani R. Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). Arch Latinoamer Nutr. 1991;41:38-51.
- Torun B, Menchú M, Elias L. Recomendaciones dietéticas diarias del INCAP. INCAP/ME/057, Guatemala. 137pp. 1996.
- Bressani R. Research needs to up-grade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). Qual Plant Plant Foods Hum Nutr. 1983;32:101-110.
- Vásquez J, Sánchez-Muniz F. Revisión: Proteína de pescado y metabolismo del colesterol. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1994;34:589-608.
- Kritchewsky D. Vegetal protein and atherosclerosis. J Am Oil Chem Soc. 1979;56:135-140.
- Tobar J. Bioavailability of Starch in processed legumes. Importance of physical inaccessibility and retrogradation. Tesis Doctoral, Universidad de Lund. 1992.
- FAO/OMS. Carbohydrates in human nutrition. (FAO Food and Nutrition Paper-66). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome. 14-18 April 1997 Reprinted 1998.
- Foster-Powel K, Holt S, Brand-Miller J. International Table of glycemic Index and glycemic load values: 2002. Am J Clin Nutr 2002;76:5-56.
- Santiago J, Levy Beshimol A, Carmona A. Effect of *Phaseolus vulgaris* lectins on glucose absorption, transport and metabolism in rat everted intestinal sacs. J Nutr Biochem 1993;4:426-430.
- Longstaff M, McNab J. The inhibitory effects of hull polysaccharides and tannins of field beans (*Vicia faba* L) on the digestion of aminoacids, starch and lipids and on digestive enzyme activities in young chicks. Brit J Nutr. 1991;65:199-216.
- Fontvieille A, Rizkalla S, Penforinis A, Acosta M, Bornet F, Slama G. The use of low glycemic index foods improves metabolic control of diabetic patients over five weeks. Diabetic Medicine. 1992;9:1-7.
- Brand-Miller J. Importance of glycemic index in diabetes. Am J Clin Nutr 1992;59:747S-752S.
- Jarvi A, Karlstrom B, Granfeldt Y, Björck I, Asp N, Vessby B. Improved glycemic control and lipid profile and lipid profile and normalized fibrinolytic activity on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic patients. Diabetes Care 1999;22:10-18.
- Behall K, Howe J. Effect of long-term consumption of amylose vs amylopectin starch on metabolic variables in human subjects. Am J Clin Nutr 1995;61:334-340.
- Goñi I, Martín-Carrón N. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. En: Lajolo F, Saura-Calixto F, Witting de Penna E, Menezes. Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Editorial Varela, Sao Paulo, 2001;311-338.

23. Bednar G, Patil A, Murray S, Grieshop C, Merchen N, Fahey G. Starch and fiber fractions in selected foods and feed ingredients affect their small intestine digestibility and fermentability and their large bowel fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *J Nutr* 2001;131:276-286.
24. Noah L, Guillon F, Bouchet B, Buléon A, Molis C, Gratas M, Champ M. Digestion of carbohydrate from white beans (*Phaseolus vulgaris* L) in healthy humans. *J Nutr* 1998;128:977-985.
25. Herrera I, González E, Romero J. Fibra dietética soluble, insoluble y total en leguminosas crudas y cocidas. *Arch Latinoamer Nutr*. 1998;48:179-182.
26. Saura-Calixto F, García-Alonso A, Goñi I, Bravo L. In vitro determination of the indigestible fraction in food. An alternative to dietary fiber analysis. *J Agric Food Chem* 2000;48:3342-3347.
27. Meyer D, Tungland B. Non-digestible oligosaccharides and polysaccharides: their physiological effects and health implications. *Advances Dietary Fibre Technology* 2001;39:455-70.
28. Siavoshian S, Segain J, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche J, Blottiere H. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelia cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 2000;46:507-514.
29. Bourdon I, Olson B, Backus R, Richter D, Davis R, Schneeman B. Beans, as a Source of Dietary Fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 Response to test meal in men. *J Nutr* 2001;131:1485-1490.
30. Duane W. Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids and sterol metabolism in humans, *J Lipid Res* 1997;38:1120-1128.
31. Wright R, Anderson J, Bridges S. Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;195:26-29.
32. Luyken R, Pikaar N, Polman H, Schippers F. The influence of legumes on the serum cholesterol level. *Voeding* 23, 447-453.
33. Brown L, Rosner b, Willet W, Sacks F. Cholesterol lowering effects of dietary fiber a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999;69:30-42.
34. Vunksan V, Jenkins D, Vidgen E, Ramsom T, Ng M, Cuthance C, O'Conner D. A novel source of wheat fibers and protein: effect on fecal bulk and serum lipids. *Am J Clin Nutr* 1999;47:367-379.
35. Anderson J, Hanna T. Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk of cardiovascular disease. *J Nutr* 1999;129:1457S-1466S.
36. Anderson J, Smith B, Moore K, Hanna T. Soy foods and health promotion. *Vegetables, fruits and herbs for health promotion*. 2000:117-134.
37. Kirsten R, Heintz B, Nelson K, Hesse K, Schneider E, Oremek G, nemeth N. Polyenylphosphatidylcholine improves the lipoprotein profile in diabetic patients. *Int J Clinical Pharm Therapeutics* 1993;32:53-56.
38. Jones P, Raeini-Sarjaz M, Ntanios F, Vanstone C, Feng J, parsons W. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J Lipid Res* 2000;41:697-705.
39. Fruhbeck G, Monreal I, Santidrian S. Hormonal implication of the hypocholesterolemic effect of intake of field beans (*Vicia faba* L) by young men with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 1997;33:1818-1827.
40. Krauss R, et al. AHA dietary guidelines. Revision 2000. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association *Circulation* 2000;102:2284-2299.
41. Abd El-Hardy EA, Habiba RA. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *Lebensm-Wiss U-Technol* 2003;36:285-293.
42. H athcock J. Residue trypsin inhibitor. Data needs for risk assessment . En: *Nutritional and toxicological consequences of food processing*. Pp 273-279. New York: Plenum Press 1991.
43. Clemente A, Domony C. Anticarcinogenic activity of protease inhibitors in legumes. En: *Proceedings of the 4th Euroean Conference on Grain Legumes*. Cracow,pp 114-115. Paris: AEP Editions. 2001.
44. Savaiano D, Power J, Costello M, Whitaker J, Clifford A. The effect of an alpha amylase inhibitor on the growth rate of weanling rats. *Nutr Rep Int* 1977;15:443-449.
45. Puls W, Keup U. Influence of an alpha-amylase inhibitor (Bay-d7791) on blood glucose, serum insulin and NEFA in starch loading test in rats, dogs and man. *Diabetologia* 1977;9:97-101.
46. Boivin M, Flourié B, Rizza R, Go V, Di Magno E. Gastrointestinal and metabolic effects on amylase inhibition in diabetics. *Gastroenterology* 1988;94:387-394.
47. Bardoez S. Effect of phytohaemagglutinin on intestinal cell proliferation. Role of polyamines. *Arch Latinoamer Nutr* 1994; 44 (Suplemento 4):16S-20S.
48. Pryme I, Puszta A, Bardoez S, Ewen S. The induction of gut hyperplasia by phytohaemagglutinin in the diet and limitation of tumour growth. *Histol Histopathol* 1999;13:575-583.
49. Sandberg A. Bioavailability of minerals in legumes. *Brit J Nutr* 2002;88 (Suppl 3): S281-S285.
50. Reddy B. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogénesis and tumour growth. *J Nutr* 1999;129:1478S-1482S.
51. Alfonso G. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. *Arch Latinoamer Nutr* 2000;50(3):281-285.
52. Costa de Oliveira A, Silva Queiroz K, Machado S, Carraro F. O processamento doméstico do feijao-comun ocasionou uma reduçao nos fatores antinutricionais fitato e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiase e verbascose. *Arch Latinoamer Nutr* 2001;51:276-283.
53. Srisuma N, Reungsakulrach S, Uebersax M, Bennink M, Hammerschmidt R. Cell wall polysaccharides of Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Agric Food Chem* 1991;39:855-858

Recibido:28-08-2003

Aceptado: 10-02-2004

Prematurity and maternal folate deficiency: Anemia during pregnancy study group results in Valencia, Venezuela

Arturo Martí-Carvajal, Guiomar Peña-Martí, Gabriella Comunián-Carrasco, Sergio Muñoz-Navarro, Mariana Luco, BChem, Arturo Martí-Peña, Carolina Medina-Laurentín

Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas, Clinical Epidemiology Unit, Universidad de Carabobo, Venezuela, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile, Endocrinological Research Center, Venezuela

SUMMARY. The purpose of this study was to determine the association and its magnitude between prematurity and folate deficiency in women in their third trimester of pregnancy, and at labor. An incident case - control study was conducted using 2 controls per case. Data was obtained in a tertiary hospital in Valencia, Venezuela. A total of 543 women who delivered between May and December 1996 entered into the study. Women having a preterm delivery (<37 weeks of gestation at delivery) were defined as cases (n = 181). Anemia was defined according to WHO as Hb less than 11 g/dL, when a pregnant woman had a folate serum level < 3 µg/ml was considered a folate deficiency. Logistic regression was used to analyze the data and likelihood ratio test was done for model comparison. Folate deficiency was found to be significantly associated with prematurity (Odds Ratio: 1.97; 95%CI = 1.06 to 3.68 $P = .032$), after adjusting for prior preterm labor, prenatal care visits, prior abortion, prior fetal death, placental abruption, and premature rupture oval membranes. In conclusion, maternal folate deficiency at the end of the third trimester of pregnancy, at labor, was associated with an increased risk of prematurity.

Key words: Prematurity, folate deficiency, odds ratio, case control, risk, pregnancy, third trimester. Venezuela.

RESUMEN. Prematuridad y deficiencia de ácido fólico: Resultados del grupo de estudio de anemia materna en Valencia, Venezuela. El objetivo del trabajo fue determinar la asociación y su magnitud entre prematuridad y deficiencia de folato. Se utilizó un diseño de casos y control (2 controles por caso), realizado en la Maternidad "Dr. J.L. Facchín de Boni", (Valencia, Venezuela). Entre mayo y diciembre de 1996 fueron estudiadas 543 embarazadas al final del tercer trimestre gestacional y en trabajo de parto. Los casos (<37 semanas de gestación, OMS) fueron 181. La anemia fue definida como la presencia de Hb < de 11 g/dL, según la OMS. La deficiencia de folato fue definida como folato sérico < 3 µg/ml. Los datos fueron analizados mediante regresión logística. Para evaluar la significancia de los modelos reducidos se utilizó la prueba de razón verosimilitud. Se determinó que la prematuridad está asociada significativamente con deficiencia de folato (OR: 1.97 IC95% = 1.06 a 3.68, $P = .032$), después de ajustar por desprendimiento placentario, ruptura prematura de membranas, partos prematuros previos, historia de abortos, historia de muerte fetal y menos de 5 visitas prenatales. En Valencia, Venezuela, la deficiencia de ácido fólico está asociada con un mayor riesgo de prematuridad.

Palabras clave: Prematuridad, deficiencia de folatos, odds ratio, casos y control, riesgo, embarazo, tercer trimestre, Venezuela, ácido fólico.

INTRODUCTION

Anemia is the main hematological complication during pregnancy. According to the World Health Organization (WHO) (1), the diagnosis of anemia during pregnancy is established when the hemoglobin (Hb) level is below 11 g/dL, being this the borderline between "physiologic anemia during pregnancy" and true anemia during pregnancy. All over the world, anemia during pregnancy is a public health problem (2,3). The nutritional anemia is the most important cause of maternal anemia. Folate deficiency (FD) is considered as the second cause of nutritional anemia.

Two reports (4,5), suggest that low folic acid intake increases the risk for preterm delivery. However, Mahomed (6) based on a systematic review in the Cochrane Library of

Systematic Review suggests that there is not enough evidence to evaluate whether folate supplementation has any effect, beneficial or harmful, on clinical outcomes for mother and baby. On the other hand, the effect of supplementing the diet with folic acid given preconceptionally or in the first half of pregnancy was a decrease in the incidence of preterm labor (7). So, there is a controversy on the impact of maternal folate deficiency (FD) on pregnancy outcome.

All studies about this issue, with or without association between prematurity and folic acid, have been performed in developed countries. The importance of this study is due to the fact of having been carried out in a developing country, in a particular city (Valencia, Venezuela) where there is a prevalence of 12% of FD during pregnancy (8).

The main objective of the present research is to determine

the association between prematurity and maternal FD, at the end of third trimester of pregnancy. A case-control study with incident cases was performed.

METHODS

Subjects and data acquisition

The "Valencia Anemia during Pregnancy Study -VAPS-" is a large study about prevalence of maternal anemia during third trimester, carried out between May and December of 1996. It was done in Maternidad "Dr. J.L. Facchín de Boni" of Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera," in Valencia, Venezuela. Details of the methods are given in other paper (9). Briefly, both cases and controls came from the VAPS above mentioned. Since pregnant women entered at labor, as much the cases as the controls delivered the same day from the admission to hospital. The inclusion criteria for this study were stated as all pregnant women in their third trimester of gestation at labor. Women with multifetal pregnancies and pregnant women who did not remember their last menstrual period (LMP) were excluded.

A medical history and physical examination were performed for all patients. A questionnaire was used to obtain information about sociodemographic, obstetric, medical non-obstetric, drugs, and exposure to toxic substance data. Gestation age at delivery was determined by last menstrual period and was confirmed by clinical examination in each patient. In each newborn, Capurro's test was done.

By using WHO criteria (1), maternal anemia was defined as Hb less than 11 g/dL in any stage of gestation, and prematurity (10) was defined as any delivery of a live single infant between 24 and 36 weeks of gestation. Only serum folate was measured in this research. We used a Folate Radioassay Kit [^{125}I] (ICN Pharmaceuticals, Orangeburg, N.Y, USA). FD was defined when serum folate level was lower than 3 $\mu\text{g/ml}$ according to Wagner (11).

Any pregnant woman having systolic blood pressure higher than or equal to 135 mm Hg and/or diastolic blood pressure higher than or equal to 85 mm Hg, or receiving antihypertensive therapy at admission was considered as hypertensive patient. Smoking and alcohol during pregnancy were also recorded. Uterine bleeding was categorized without, bleeding in just one trimester and with bleeding in more than two trimesters.

No attempt was made to match the controls for age, parity, or any other variable. Ethnic group classification was not attempted due to the considerable race mixture in our population.

At labor, 12 ml of venous blood were obtained in a EDTA containing tube to perform a complete blood count (CBC) using an electronic counter Cobas Helios 3ä (Roche Diagnostic Systems). Blood sample was analyzed at main

hospital laboratory within a 2-hour period after drawn.

This research was approved by the Ethical Committee of the Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera", and free informed consent was obtained from all patients enrolled into the study.

Data analysis

Sample size was determined assuming 37% prevalence of anemia in the controls, with an expected minimum prevalence of 50% in cases. In addition, it is assumed a 95% confidence level, 80% power, and a ratio of 2 controls per case. The final sample size was 543 pregnant women (181 cases and 362 controls). Epi Info software (version 5.0, CDC, Atlanta, Ga) was used to perform sample size calculation.

Data are presented as mean \pm SD unless otherwise noted. Categorical variables were compared by using chi-square test or Fisher's exact test when it was appropriate. Continuous variables were analyzed by using the Student's *t*-test for unpaired data. Stratified analysis was done using the Mantel-Haenszel procedure. To adjust for potential confounding factors, multiple logistic regression was used in order to determine the association between prematurity and maternal anemia and its magnitude. Model evaluation was done by using likelihood ratio test (12-14). Only biologic variables and other variables clearly associated with prematurity were included in the initial model to avoid a final model that could lack logical explanation (15). Initial model was composed by prematurity as the dependent variable, maternal folate deficiency as the exposure variable, and age, obstetric variables [placental abruption, premature rupture of membranes (PROM), previous preterm birth, number of prenatal care visits (PCV) and uterine bleeding], hypertension and smoking, as potential confounders.

A two-tailed P value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. Stata version 6.0 (Stata Corp, College Station, Houston, Tx) was used for statistical analysis.

RESULTS

In total sample, mean of serum folate levels (\pm SD) (n = 543) was 7.6(\pm 5.5) mg% (95%CI = 7.1 to 8.0). Range was 0.4 to 24 mg%.

Mean age (\pm SD) in the non-FD group (n = 494) was 24.5(\pm 6.7) years (95%CI = 23.6 to 24.8) while in the FD group (n=49) it was 23.3(\pm 6.7) years (95%CI = 21.4 to 25.2 P = .37).

Mean of gestational age (\pm SD) in the non-FD group (n = 494) was 37.4(\pm 3) weeks (95%CI = 37.1 to 37.7) while in the FD group (n = 49) it was 35.8(\pm 3.4) weeks (95%CI = 34.9 to 36.8 P = .0007).

Mean of Hb (\pm SD) in the preterm group (n=181) was

10.71(±1.7) g/dL (95%CI = 10.46 to 10.96) while in the control group (n=362) it was 11.54(±1.4) g/dL (95%CI = 11.39 to 11.69 P = .001).

Of the five hundred and forty three pregnant women, 20.8% (113/543) did not receive folic acid supplement. In those patients (n =113), 55% had anemia.

Table 1 shows the risk of prematurity according to the serum folate's level of the pregnant women.

TABLE 1

Risk of prematurity in pregnant women with FD according to serum folate levels

Prematurity	Level of Serum Folate (µg/ml)					
	<=3.4	<= 3.0	<= 2.5	<=2	<=1.5	<=1
n	132	123	81	61	36	20
OR	2.71	2.81	3.6	4.4	3.97	5.4
95%CI	1.3 to 5.6	1.3 to 5.9	1.4 to 9.3	1.5 to 13.3	1.01 to 15.4	0.85 to 3.4
p	0.007	0.006	0.006	0.006	0.046	0.07

Crude evaluation of association between prematurity and FD showed an OR of 2.25 (95%CI = 1.25 to 4.05 P = .005). After adjustment for potential confounders, OR and their 95%CIs show that maternal FD during pregnancy in third trimester is an important predictor of prematurity. Table 2 shows the final model.

TABLE 2

Final model of association between prematurity and maternal folate deficiency

Variable	Odds ratio	95% CI	P
Folate deficiency anemia	1.97	1.06 to 3.68	.03
Placental abruption	12.7	1.47 to 109	.02
PROM	2.1	1.37 to 3.23	.001
Previous preterm delivery	3.0	1.53 to 5.92	.001
Prior abortion	1.5	1.06 to 2.01	.02
Previous fetal death	3.3	1.24 to 8.80	.01
Prenatal care visits			
No visits*	1		
1 to 4	0.9	0.51 to 1.76	0.87
5 to 7	0.6	0.33 to 1.07	0.08
≥8	0.4	0.20 to 0.80	0.01

PROM: premature rupture of membranes

* reference group

DISCUSSION

Prematurity is the major cause of perinatal mortality (16). The findings of this study support our hypothesis that folic acid deficiency (FD) during pregnancy, evaluated during third trimester, and at labor, is a risk factor for prematurity.

After adjustment for potential confounding factors, we have shown that the effect associated with FD remains recognizable. Therefore, our results suggest that there is an increased risk of a poor obstetric outcome when the level of serum folate is less than 3 µg/ml. Our results have concordance with what Sifakis and Pharmakides (17) stated about the fact that FD is more common in women who are not receiving prenatal folic acid supplements.

What mechanisms could explain the association between FD and prematurity? Folic acid plays an important role in the conversion of homocysteine in methionine (18). The relationship between serum folate and homocysteine may be useful for detecting borderline folic acid deficiency in pregnancy (19). A metabolic effect of folic acid deficiency is an elevation of blood homocysteine, so, total homocysteine (tHcy) measured in serum or plasma is a marker of folate status. Therefore, the biological plausibility could be explained using the possibility of occurrence of hyperhomocysteinemia. Epidemiological studies have shown that increased serum homocysteine concentrations well inversely correlated with folate concentrations (20). Increased circulating total homocysteine concentrations are associated with higher risk for premature vascular disease (21,22). Since, hyperhomocysteinemia disturbs the vascularization of the placenta and thereby reduces its function, a hypothesized pathway is a gene-environment interaction based on a highly prevalent mutation in the gene for methylenetetrahydrofolate (MTHFR), combined with low folic acid intake, consequent hyperhomocysteinemia, and decidual vasculopathy (23). In Hordaland Homocysteine study, Vollset et al (24) have pointed out that elevated tHcy concentration is associated with common pregnancy complications and adverse pregnancy outcomes.

Hyperhomocysteinemia could be mediated, at least, by two mechanisms: nutritional depletion of folic acid (by low intake and/or by increased catabolism) and/or as an indirect consequence of endogenous overuse of antioxidant vitamins (folic acid) during prolonged states of immune activation (25). Due to increased needs for fetal growth, placenta, and maternal tissues, pregnancy imposes stress on folate stores (26), it seems to be due to the accelerated breakdown of the vitamin because of its participation in cellular biosynthesis. According to studies in rat models, an increased folate turnover may occur during pregnancy, it means elevated rates of folate catabolism (27). Higgins et al (28) estimated rate of folate catabolism in pregnant and non-pregnant women and they found that rate progressively increases during pregnancy reaching a peak in the third trimester at the time of maximal fetal growth. McPartlin et al, measuring folate breakdown products p-amino-benzoylglutamate (pABGlu) and its acetylated derivate p-acetamidobenzoylglutamate (apABGlu), have also found accelerated folate breakdown in pregnancy (29). Therefore, the hypothesis could now be

formulated as: a high homocysteine level in the blood, even with normal folic acid levels, could be the toxic agent for the developing embryo.

During pregnancy, *what should the daily supply of folic acid be?* During pregnancy, a daily intake of 400µg has been advised, and it has been argued that synthetic folic acid (tablets or enriched food) is much better absorbed and more readily available than natural folic acid (30). However, based on the results of a study on the relationship between increased folate catabolism and the increased requirement for folate in pregnancy, Higgins et al (28) have recommended that dietary allowance for folic acid during pregnancy should be 430 µg in the second trimester and 540 µg in third trimester. Besides, Cuadill et al (31) suggest that 450 µg/day is sufficient to maintain folate status in pregnant women. In brief, the folic acid supplementation doses fluctuate between 400 and 540 µg/day. Folic acid is a micronutrient of particular importance for prevention of adverse pregnancy outcomes (32,33).

We believe this study may have two limitations; interpretation of the results must take these into account. First, there is a chance of recall bias in the process of gathering data. Given low income and low socioeconomic status of the pregnant women of this study, it was not feasible to carry out longitudinal studies. These studies tend to be more costly and need many logistic problems in their execution. Second, it is difficult to determine the prevalence of folic acid deficiency in the pregnant women because of the criteria used to define folic acid deficiency, even though we used the usually accepted criterion (serum folate level <3.0 µg/ml). There are large inter- and intra- methods variations, estimated dietary folic acid intakes are not reliable, and we determined only serum folate concentrations. However, in our country this is the first time that a research like this has been carried out.

In conclusion, according with these results, there is a risk of prematurity in pregnant women with folic acid deficiency, therefore, it is advisable the consumption of this micronutrient during the pregnancy. Folic acid is key for optimal macronutrient metabolism because of its essential role in metabolism. Undoubtedly, preterm delivery has a multifactor origin where it is not discarded a chronic degenerative process in the placenta intimately associated with a folic acid imbalance. The need to design an educational program about appropriate use of prenatal care may be one of the implications of this study. Educational efforts addressing appropriate use of prenatal care should be initiated in our city. All efforts to change patterns of use of the prenatal care program must be encouraged.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant #CDCH-UC-742-97 from Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico of

Universidad de Carabobo, Venezuela. We would like to thank Olga Jiménez, MT, and Julieta Torrealba, MT, for their help in doing CBC. Alike, we want to express our thanks to Mrs. Elizabeth García and Mrs. Dulce Quiñonez for their help in doing serum folate.

REFERENCES

1. World Health Organization. Nutritional Anemias: report of a WHO Scientific Group. Geneva, Switzerland: 1968, Tech Rep Series 405.
2. Dallman PR, Yip R, Johnson C. Prevalence and causes of anemia in the United States, 1976 to 1980. *Am J Clin Nutr* 1984; 39:437-445.
3. Yip R. Iron deficiency: Contemporary scientific issues and international programmatic approaches. *J Nutr* 1994;124:1479S-1490S.
4. Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Khoo CS, Fischer RL. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:520-5.
5. Shaw GM, Liberman RF, Todoroff K, Wasserman CR. Low birth weight, preterm delivery, and periconceptional vitamin use. *J Pediatr*. 1997;130:1013-1014.
6. Mahomed K. Folate supplementation in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000183.
7. Rolschau J, Kristoffersen K, Ulrich M, Grinsted P, Schaumburg E, Foged N. The influence of folic acid supplement on the outcome of pregnancies in the county of Funen in Denmark. Part I. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;87:105-110; discussion 103-4.
8. Martí-Carvajal A, Peña-Martí G, Comunián G, Muñoz S. Prevalence of Anemia during Pregnancy: Results of Valencia (Venezuela) Anemia During Pregnancy Study. *Arch Lat Nutr* 2002;52: 5-11.
9. Martí A, Peña- Martí G, Muñoz S, Lanás F, Comunián G. Association between prematurity and maternal anemia in Venezuelan pregnant women during third trimester at labor. *Arch Lat Nutr* 2001;54:44-48.
10. World Health Organization. International classification of diseases: manual of the international statistical classification of disease, injuries and causes of death. Ninth Revision. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1977.
11. Wagner C. Folic acid. In: present Knowledge in Nutrition. Fifth edition. The Nutrition Foundation Inc., Washington, D.C., pp332-346, 1984.
12. Kleinbaum D, Kupper L, Muller KE. Applied regression analysis and other multivariable methods. PWS-Kent Publishing Company. Boston, 1988.
13. Schlesselman JJ. Case-Control Studies. Design, conduct, analysis. New York: Oxford Univ. Press; 1982.
14. Rothman KJ. Modern Epidemiology. Boston: Little Brown, 1986.
15. Silva Ayçaguer LC. Excursión a la regresión logística en ciencias de la salud. Madrid: Ed. Díaz de Santos, 1995.
16. Hudleston JF. Preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1982; 25:123-136.

17. Sifakis S, Pharmakides G. Anemia in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:125-136.
18. Hoffbrand AV, Weir DG. The history of folic acid. *Br J Hematol* 2001;113:579-589.
19. McMullin MF, Young PB, Bailie KEM, Savages GA, Lappin TRJ, White R. Homocysteine and methymalonic acid as indicators of folate and vitamin b12 deficiency in pregnancy. *Clin Lab Haem* 2001;23:161-165.
20. Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Bowman BA, Gunter EW, Wright JD, Johnson CL. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999;131:331-9.
21. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995;332:286-291.
22. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1997;277:1775-1781.
23. Kramer MS, Goulet L, Lydon J et al. Socio-economic disparities in preterm birth: causal pathways and mechanisms. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2001;15(Suppl. 2):104-123.
24. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: The Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-968.
25. Widner B, Enzinger C, Laich A, Wirleitner B, Fuchs D. Hyperhomocysteinemia, pteridines and oxidative stress. *Curr Drug Metabol* 2002;3:225-232.
26. McNulty H, McPartlin JM, Weir DG, Scott JM. Folate catabolism is increased during pregnancy in rats. *J Nutr* 1993;123:1089-1093.
27. Suh JR, Herbig AK, Stover PJ. New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev Nutr* 2001;21:255-282.
28. Higgins JR, Quinlivan EP, McPartlin J, Scott JM, Weir DG, Darling MR. The relationship between increased folate catabolism and the increased requirement for folate in pregnancy. *BJOG* 2000;107:1149-1154.
29. McPartlin J, Halligan A, Scott JM, Darling M, Weir DG. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet* 1993;341:148-149.
30. Eskes T KAB. Open or closed? A world of difference: A history of homocysteine research. *Nutr Rev* 1998;56:236-244.
31. Caudill MA, Cruz AC, Gregory JF 3rd, Hutson AD, Bailey LB. Folate status response to controlled intake in pregnant women. *J Nutr* 1997;127:2363-2370.
32. Bendich A. Micronutrients in women's health and immune function. *Nutrition* 2001; 17: 858-67.
33. Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ* 2004;328:211-214.

Recibido: 19-09-2002

Aceptado: 28-01-2004

Índice epidemiológico de nutrición infantil basado en un modelo polinomial de los valores de puntuación Z del peso para la edad

Avila-Curiel A., Shamah T., Barragán L., Chávez A., Avila MA, Juárez L.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Instituto Nacional de Salud Pública de México

RESUMEN. Se propone un índice que modeliza la función matemática de los promedios de la puntuación Z del peso para la edad de 60,079 niños menores de 5 años de la República Mexicana obtenidos a partir de muestras probabilísticas. El modelo matemático de mayor precisión fue un polinomio de quinto grado. El coeficiente de correlación se ubicó en el intervalo $.937 < R < .999$. El índice propuesto es la integral de la función polinomial, lo cual representa la brecha nutricional entre la población observada y la población de referencia. A partir de este modelo se analizan las características de las distintas poblaciones observadas. A nivel nacional, se observa una mejoría entre los años 1988 y 1999 al pasar de -39.6 a -16.8 . Esta mejoría es mayor en el medio urbano (-36.4 a -8.4), que en el medio rural (-48.8 en 1989, a -37.7 en 1999). La población rural indígena del país presentó los mayores niveles de desnutrición: -54.4 , mientras que para la población rural no indígena el índice fue de -37.1 . En la ciudad de México en 1995 el índice fue de -5.9 , promedio de una polarización nutricional, ya que en los estratos socioeconómicos inferiores fue de -17.3 y en los estratos superiores de 18.0 , lo que revela la emergencia de problemas de obesidad infantil. Este índice es útil para estimar la magnitud y las características de la dinámica epidemiológica de la desnutrición en edades tempranas y evaluar efectos de diversas intervenciones, sin que se vea afectado por los sesgos habituales al usar prevalencias de desnutrición.

Palabras clave: Desnutrición infantil, peso para la edad, índice nutricional, indicadores de estado de nutrición.

SUMMARY. An epidemiological index to assess the nutritional status of children under five years of age in Mexico. A nutritional status index was built by modeling the mathematical function of the mean Z scores of weight for age, from 60,079 children under five years of age, selected in a probabilistic fashion from the Mexican population. The most precise mathematical model was a fifth degree polynomial. The correlation coefficient was between $.937 < R < .999$. The proposed index is the integral of the polynomial function, which represents the nutritional gap between the observed and the reference population. This model is used to analyze the characteristics of the different study populations. The index shows an improvement of -39.6 to -16.8 at the national level, between the years 1988 and 1999. This improvement is greater in urban (-36.4 to -8.4) than in rural areas (-48.8 in 1989, to -37.7 in 1999). The indigenous rural population of the country showed the highest levels of malnutrition (-54.4), as compared to the non-indigenous rural population (-37.1). In Mexico, City, the index was -5.9 in 1995, which represents an average of extreme nutritional values: -17.3 in the lower socioeconomic strata and 18.0 in the higher strata, the latter suggesting the presence of childhood obesity. This index is useful to estimate the epidemiological burden and the characteristics of malnutrition at early ages, as well as to assess the impact of interventions, without being altered by common biases related to the utilization of malnutrition prevalence values.

Key words: Childhood malnutrition, weight for age, nutritional index, nutrition status indicators.

INTRODUCCION

La desnutrición infantil se reconoce como uno de los principales problemas de salud y bienestar social de América Latina. La mayor parte de las muertes evitables en la niñez latinoamericana están relacionadas con la desnutrición infantil, acentuándose por el ambiente hostil característico de la pobreza extrema (1,2).

Países como Chile, Cuba y Costa Rica han podido disminuir su prevalencia de desnutrición en la medida que han logrado articular sistemas atención y de vigilancia epidemiológica, lo cual les ha permitido un combatir de manera eficiente a la desnutrición infantil (3-5).

El fin de obtener datos y vigilar el estado de nutrición de la población es transformar los datos en acciones específicas,

encaminadas a mejorar el estado de nutrición y de salud en general de los grupos afectados. En este sentido, es necesario establecer métodos que nos permitan describir en forma clara y precisa las características epidemiológicas que presenta nuestra población, asimismo es de vital importancia la sistematización, interpretación y la evaluación imparcial de los resultados (6).

Diversos autores han realizado esfuerzos para desarrollar métodos de procesamiento de la información antropométrica que permitan validar, comparar y evaluar los datos de diferentes estudios. Algunos proponen, por ejemplo, la utilización del método de sensibilidad y especificidad para precisar la confiabilidad de una prueba diagnóstica de algunos indicadores antropométricos (2,7,8).

Se ha propuesto también la utilización del método de riesgos para decidir cuál es la manera más eficiente de utilizar los recursos, evaluando la efectividad de las intervenciones una vez que el estudio epidemiológico ha sido instrumentado (OPS;1986) (9,10). Por otro lado, se han realizado propuestas para mejorar los métodos de investigación por medio de la utilización de índices que reflejen el problema de estudio con menos datos y con la posibilidad de detectar rápida y eficientemente a la población en riesgo (11,12).

Los requerimientos mínimos para que un índice sea válido es que refleje las dimensiones socioeconómicas de las desigualdades en salud, así como el comportamiento de la población, y que sean sensibles a cambios temporales en la distribución de la población entre los grupos socioeconómicos (13).

En este contexto, México desde la década de los 50's ha realizado esfuerzos por evaluar el problema de la desnutrición. Entre ellos se encuentran las Encuestas Nacionales de Alimentación en el Medio Rural Mexicano (ENAL74,79,89 y 96) (14-17) y las Encuestas Nacionales de Nutrición (ENN-88,99) (18,19), así como la Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la zona Metropolitana de la Ciudad de México en 1995 (ENURBAL-95) (20). Estos estudios epidemiológicos, en general se han limitado al análisis de prevalencias, medidas de tendencia central y dispersión de algunos indicadores del estado nutricional.

Los indicadores antropométricos elegidos pueden ser una fuente de error al clasificar niños desnutridos como normales (falsos negativos) y a niños normales como desnutridos (falsos positivos), como expresión de la relación inversa entre sensibilidad y especificidad (21-24) y dependiendo de los objetivos que persiga el estudio (25). La OMS ha recomendado la utilización del indicador peso para la edad como el indicador más útil para la evaluación del estado de nutrición en los niños menores de 5 años (26).

El reporte de resultados como prevalencias simples de desnutrición no permite evaluar objetivamente las diferencias observadas entre poblaciones. Los indicadores utilizados, los puntos de corte que se emplean para categorizar el estado de nutrición, y la estructura etárea de la población estudiada pueden sesgar considerablemente la prevalencia.

El peso para la talla subestima la desnutrición en niños con talla muy baja, clasificándolos frecuentemente como normales, así como también tiende a sobreestimar la desnutrición en niños con talla alta, a quienes puede clasificar erróneamente con déficit de peso (27). En el mismo sentido, Dibley et al (28,29) refieren las limitaciones del uso de las curvas estandarizadas de crecimiento en las poblaciones de niños cuyo crecimiento ha sido afectado en forma importante por la desnutrición, particularmente al utilizar el indicador peso para la talla, ya que la detención del crecimiento altera la proporcionalidad de los segmentos corporales y anula la

pertinencia de una población de referencia basada en niños con talla y proporción normal de segmentos corporales (30, 31).

Respecto a los puntos de corte para discriminar normalidad y grados de desnutrición, Mora (32) ha señalado el carácter arbitrario de los recomendados por la Organización Mundial de la Salud, e indicado la conveniencia de ajustar la prevalencia obtenida con estos puntos de corte, en relación con la esperada en la población de referencia; esto es, 15.9% y 2.3% a $-1z$ y $-2z$, respectivamente.

La estructura etárea puede sesgar notablemente la comparabilidad de la prevalencia de desnutrición observada en una población. Por ejemplo, con datos obtenidos de la Encuesta Nacional de Nutrición y Alimentación en el Medio Rural en 1996 se encontró que las prevalencias de desnutrición de los menores de 5 años según edad de la madre, era más alta en hijos de mujeres con edad mayor de 36 años (46.8%) que en los hijos de madres menores de 18 años (44.6%) (34). Sin embargo, la distribución etárea difiere notablemente entre ambos grupos: los hijos menores de un año de las madres adolescentes representan el 33% del total de los niños menores de 5 años, en tanto que los de las madres mayores de 36 años, únicamente representan el 8.5%. Al ajustar la prevalencia de desnutrición de los niños de madres adolescentes por la estructura de edad de los hijos de madres de mayor edad, dicha prevalencia se incrementa a 55.3%.

El objetivo del presente estudio es construir un índice que permita evaluar dinámicamente y diagnosticar objetivamente las características del estado de nutrición de la población menor de 5 años, el cual no se vea afectado por la estructura de la población ni por el punto de corte utilizado.

MATERIALES Y METODOS

Para la construcción de este índice se contó con cinco grupos de datos procedentes de encuestas probabilísticas: Las bases de datos de las Encuestas Nacionales de Alimentación en el Medio Rural Mexicano 1989 y 1986 (ENAL 89 y 96), la Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la zona Metropolitana de la Ciudad de México 1995 (ENURBAL-95); se contó también con tabulados especiales de las Encuestas Nacionales de Nutrición 1988 y 1999 (ENN-88,99). El total de niños evaluados en los cinco grupos de datos fue de 60,079 (Tabla 1).

Para cada grupo de datos se obtuvo el promedio de puntuación z del peso para la edad (Z_{pe}), en relación a la población de referencia NCHS-OMS (34), y el promedio de edad de todos los casos válidos, en nueve grupos etáreos de entre 0 a 60 meses que corresponden, a etapas donde ocurren cambios importantes en el ritmo de crecimiento de los niños en países con problemas de desnutrición infantil (35).

TABLA 1
Grupos de datos antropométricos analizados para el desarrollo del índice epidemiológico polinomial de nutrición infantil

Grupo de datos	Año	Nº de niños	
1 1ª Encuesta Nacional de Nutrición	ENN 88	1988	7426
2 2ª Encuesta Nacional de Nutrición	ENN 99	1999	7831
3 3ª Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural	ENAL 89	1989	15329
4 4ª Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural	ENAL 96	1996	28429
5 1ª Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Cd. de México	ENURBAL 95	1995	1064
Total			60,079

Mediante el programa Curve expert 3.1 (36) se probaron diversos modelos de ajuste matemáticos para modelar la relación entre los promedios de la puntuación z del peso para la edad respecto a la referencia NCHS-OMS (Z_{pe}) y los promedios de edad en los nueve grupos etáreos referidos en 28,439 niños estudiados en la ENAL 96 (Tabla 2). El mejor ajuste ($R=0.987$), entre 30 modelos matemáticos no lineales explorados, fue el polinomio de quinto grado:

$$f(x) = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4 + fx^5$$

La modelización de los promedios Z_{pe} de los nueve grupos etáreos calculados a partir de la base de datos de la ENAL 96 se presenta en la Figura 1.

El índice nutricional propuesto en el presente trabajo es la integral de esta función polinomial, es decir, el área entre la curva del polinomio y el eje de las abscisas, el cual cuantifica la brecha existente entre la población estudiada y una población teóricamente libre de desnutrición, entre los 0 y los 60 meses de edad, cuyos promedios Z_{pe} serían iguales a cero en todos los intervalos de edad:

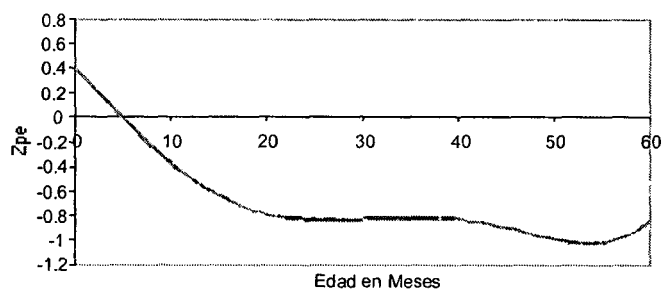
$$\int_0^{60} f(x) = ax + \frac{bx^2}{2} + \frac{cx^3}{3} + \frac{dx^4}{4} + \frac{ex^5}{5} + \frac{fx^6}{6}$$

Obviamente, en promedio, los valores negativos del índice indican deficiencia de peso para la edad y los valores positivos son indicativos de sobrepeso.

TABLA 2
Edad y puntuación z promedios del peso para la edad de los niños menores de 5 años estudiados por la ENAL 1996, según intervalos de edad

Intervalo de edad	n	Edad promedio	z promedio
0 a 2.9	658	1.5	0.20
3 a 5.9	787	4.4	0.19
6 a 11.9	1,787	9.2	-0.40
12 a 23.9	4,035	18.0	-0.76
24 a 35.9	5,418	30.2	-0.75
36 a 47.9	7,442	42.1	-0.93
48 a 53.9	4,604	50.9	-0.96
54 a 56.9	2,143	55.5	-0.99
57 a 59.9	1,555	58.3	-0.95
TOTAL	28,429	35.7	-0.79

FIGURA 1
Modelización de los promedios Z_{pe} de nueve grupos etáreos calculados a partir de los datos de la ENAL 1996, México 1996



Los valores de este índice pueden ser estimados fácilmente para cualesquiera intervalos de edad, como la integral definida para tales valores de x correspondientes a la edad en meses. En este sentido denotamos el índice con el símbolo: aI_w , donde a y w corresponden a los límites inferior y superior, respectivamente, del intervalo de edad en meses. Por ejemplo, ${}_0I_{60}$ corresponde al índice de la población comprendida entre la edad de 0 y 60 meses; ${}_0I_{12}$ al del intervalo de edad de 0 a 12 meses, y así consecuentemente.

Una vez definido el modelo, a continuación se procedió a calcular el índice para cada uno de los cinco grupos de datos antropométricos referidos. El coeficiente de correlación de este modelo respecto a los promedios calculados para los cinco conjuntos de datos se ubicó en el intervalo

.937 < R < .999. Posteriormente se calculó el índice correspondiente a los estratos geográficos, grupos étnicos, género, nivel socioeconómico, condición étnica y urbano-rural, de acuerdo a la información disponible en cada conjunto de datos.

Dado que la ENN 88 no tuvo un diseño muestral que permitiera la diferenciación urbano-rural, al índice nacional se le imputó una diferenciación urbano-rural a partir del índice rural de la ENAL 89 (-48.8) como estimador proximal; si se considera un porcentaje del 25% de la población rural (localidades con menos de 2500 habitantes) respecto a la población total del país de acuerdo con el Censo Nacional de Población 1990 (37), tenemos que:

$$IN_{88} = .25 IR_{89} + .75 IU_{88} = -39.6 \quad (1)$$

donde:

IN_{88} es el I_{0-60} nacional 1988

IR_{89} es el I_{0-60} rural obtenido en la ENAL 89

IU_{88} es el I_{0-60} urbano 1988

por lo que:

$$IU_{88} = (39.6 - .25 (48.8)) / .75 = 36.5 \quad (2)$$

Cabe indicar que para referir la magnitud del índice en el presente trabajo se hace en función de su valor absoluto y no de su valor relativo; es decir, conceptualmente, un índice de -39 se considera "mayor" que -25, en tanto que expresa una magnitud mayor de deterioro nutricional de una población, y no una relación matemática en la que, obviamente, $-25 > -39$.

RESULTADOS

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los cinco conjuntos de datos de las encuestas probabilísticas analizadas. A continuación se detallan los resultados para cada uno de los cinco conjuntos de datos.

Encuestas Nacionales de Nutrición 1988-1999

De acuerdo con el I_{0-60} , a nivel nacional, se observa una mejoría ostensible entre los años 1988 y 1999 al pasar de -39.6 a -16.8, es decir un coeficiente de variación de (57.6 %) Esta mejoría corresponde fundamentalmente con la mejoría observada en el medio urbano con un descenso de -36.5 a -8.4 (76.9%), en tanto que en el medio rural el índice descendió tan sólo de -48.8 a -37.7 (22.5%). En consecuencia 1988 el I_{0-60} rural era del 34% mayor que el I_{0-60} urbano, en tanto que en 1999 la diferencia fue de 447%.

La presentación del índice por intervalos anuales de edad

muestra que en 1988 el I_{0-12} es menor que los índices de las edades siguientes: de -4.87; el deterioro se incrementa a valores entre -8.02 y -9.58 en los siguientes cuatro años de vida. En 1999 el I_{0-12} es de 1.77 indicativo de sobrepeso; en las edades los subsecuentes se observaron valores de deterioro entre -3.61 y -5.85.

TABLA 3

Índice de desnutrición infantil en distintas encuestas nacionales de nutrición según grupos étnicos y diferentes estratos

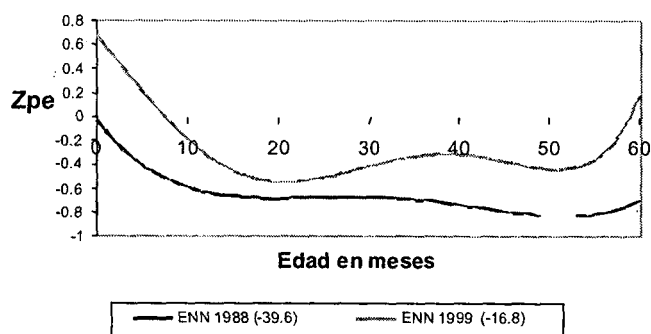
Encuesta/ estrato	0 a 12	12 a 24	24 A 36	35 A 48	48 A 60	Índice	R
ENN 1988							
Rural	—	—	—	—	—	-48.8	—
Urbana	—	—	—	—	—	-36.5	—
Hombres	-5.17	-8.33	-7.75	-8.92	-10.43	-40.60	0.980
Mujeres	-4.47	-7.52	-8.32	-9.17	-8.71	-38.19	0.984
Total	-4.87	-8.02	-8.1	-9.0	-9.58	-39.6	0.999
ENN 1999							
Rural	0.26	-9.57	-10.30	-9.29	-8.76	-37.66	0.949
Urbana	2.39	-4.06	-2.93	-1.86	-1.96	-8.43	0.969
Hombres	0.8	-7.0	-5.7	-4.1	-5.1	-21.2	0.978
Mujeres	2.6	-4.8	-4.5	-4.6	-3.8	-15.0	0.960
Total	1.77	-5.85	-4.98	-4.15	-3.61	-16.82	0.995
ENURBAL 95							
inferior	-3.52	-4.29	-2.11	-3.63	-3.75	-17.30	0.836
superior	2.75	3.99	6.36	4.68	0.25	18.03	0.980
Total	-1.29	-1.42	0.72	-1.30	-2.57	-5.87	0.937
ENAL89							
Indigenismo							
indígena	-8.38	-18.59	-17.61	-16.45	-18.25	-79.28	0.974
presencia	-4.46	-10.83	-10.02	-8.66	-9.95	-43.93	0.923
no indígena	-2.82	-7.72	-7.88	-6.92	-7.30	-32.64	0.918
Sexo							
hombres	-5.81	-12.58	-11.53	-10.32	-12.57	-52.81	0.940
mujeres	-3.70	-10.41	-11.10	-10.06	-9.62	-44.90	0.960
Total	-4.74	-11.49	-11.34	-10.19	-11.06	-48.82	0.949
ENAL96							
Región							
Norte	4.02	-2.31	-3.29	-4.73	-6.36	-12.66	0.995
Centro	1.68	-12.06	-9.94	-9.55	-11.42	-41.29	0.959
Sur	-3.89	-12.66	-13.92	-14.07	-15.35	-59.89	0.990
Indigenismo							
indígena	-1.62	-11.31	-13.42	-13.36	-14.75	-54.46	0.961
presencia	-2.44	-9.49	-10.81	-10.91	-11.83	-45.48	0.991
no indígena	-0.51	-7.82	-9.18	-8.92	-10.97	-37.40	0.990
Sexo							
hombres	-2.06	-9.42	-9.97	-10.26	-11.83	-43.54	0.978
mujeres	0.45	-7.62	-9.79	-10.46	-11.67	-39.09	0.991
Total	-0.86	-8.56	-9.88	-10.35	-11.76	-41.40	0.987

Se pueden apreciar también diferencias de los índices por sexo. En 1988 el I_{0-60} de los niños fue 6% mayor que el de las niñas, en tanto que en 1999 dicha diferencia fue del 41%, expresándose ya en forma clara una tendencia al sobrepeso en el I_{0-12} de las niñas.

La representación gráfica del modelo polinomial de estas encuestas se presentan en la Figura 2.

FIGURA 2

Comparación del Índice Polinomial en menores de 5 años. Encuestas Nacionales de Nutrición, México 1988 y 1999

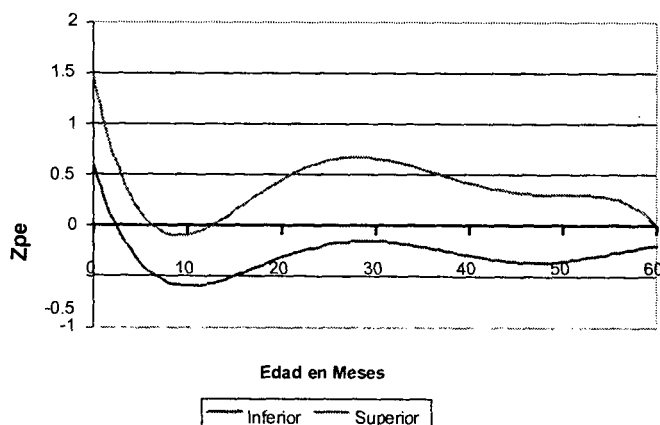


Encuesta Urbana Ciudad de México

En 1995 en la ciudad de México el I_{0-60} fue de -5.9 . Al evaluar en forma separada este índice para los niños de los estratos socioeconómicos inferior y superior se observa una notable polarización alimentaria, ya que en los estratos socioeconómicos inferiores fue de -17.3 y en el estrato superior fue de 18.0 , lo que es indicativo de un sobrepeso importante en los niños de este estrato (Figura 3).

FIGURA 3

Comparación del Índice Polinomial de desnutrición infantil de los estratos socioeconómicos Superior e Inferior de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, 1995



Por intervalos anuales el índice del estrato inferior urbano muestra, a diferencia de lo observado en las ENN 88 y 99, que no hay progresión importante en el deterioro nutricional entre el I_{0-12} (-3.52), y los subsecuentes grupos etáreos (de -2.11 a -4.29). Sin embargo sí se observa una progresión en el sobrepeso de los estratos superiores al pasar de un I_{0-12} de 2.75 a un I_{12-24} de 3.99 y un I_{24-36} de 6.36 .

Encuestas Nacionales en el Medio Rural 1989 y 1996

El I_{0-60} en las localidades rurales descendió de -48.8 en 1989 a -41.3 en 1996. Esta disminución se dio a expensas del I_{0-36} el cual disminuyó en un 30% (-27.6 a -19.3), en tanto que el I_{36-60} únicamente presentó una variación mínima en sentido opuesto (-19.3 a -22.1).

Hubo también una notable disminución del deterioro nutricional en las localidades indígenas al pasar el I_{0-60} de -78.3 a -54.5 , lo que representa una disminución del 31% en la brecha nutricional. No obstante esta mejoría, la población rural indígena del país es la que presenta los mayores niveles de desnutrición en 1996: 45% superior a la del medio rural no indígena.

Las diferencias por género son consistentes en prácticamente todos los grupos de edad de las ENAL 89 y 96. Los hombres suelen presentar un mayor deterioro nutricional que las mujeres; en 1989 el I_{0-60} de los niños (-52.8) fue 18% superior al de las niñas (-44.9). En 1999 esta diferencia fue del 11% (-43.5 y -39.1 , niños y niñas respectivamente).

El análisis regional se realizó únicamente para la ENAL 96. El I_{0-60} revela una gran polarización nutricional norte-sur, congruente con las características sociales y geoeconómicas del país. En la región Norte este índice es de tan solo -12.7 , observándose una tendencia al sobrepeso en el I_{0-12} (4.0). En la región Centro el I_{0-60} es de -41.3 , en tanto que en la región Sur se eleva hasta 54.5 .

Se realizó también el cálculo de los índices anuales y total para cada Estado de la República Mexicana, las cuales se presentan en la Tabla 4. Los estados de Sonora y Baja California Sur muestran ya un I_{0-60} con valores indicativos de sobrepeso: 17 y 8.4 , respectivamente. Con mucho Guerrero es el estado con mayor deterioro nutricional ($I_{0-60} = -75.1$) seguido de los estados de Puebla, Yucatán, Oaxaca y Quintana Roo (I_{0-60} entre -58.8 y -64.5).

TABLA 4
 índice de desnutrición infantil de la Encuesta Nacional de Nutrición en el Medio Rural 1996,
 por entidad federativa y grupos etáreos

Entidad	Región	0 a 12	12 a 24	24 A 36	35 A 48	48 A 60	Índice	R
01 AGUAS CALIENTES	Norte	-1.11	-2.14	-0.47	-7.45	-9.95	-21.12	0.975
02 BAJA CALIFORNIA	Norte	2.75	-0.68	2.23	0.03	-3.75	0.57	0.896
03 BAJA CALIFORNIA SUR	Norte	9.07	5.00	1.98	-2.18	-5.52	8.35	0.811
04 CAMPECHE	Sur	-5.64	-10.02	-11.75	-11.46	-13.05	-51.92	0.967
05 COLIMA	Centro	8.62	-3.76	-4.67	-6.72	-8.76	-15.29	0.992
06 COAHUILA	Norte	0.56	-8.18	-3.46	-3.63	-9.15	-23.86	0.900
07 CHIAPAS	Sur	0.01	-9.39	-11.94	-13.48	-14.58	-49.38	0.986
08 CHIHUAHUA	Norte	7.56	-4.97	-6.83	-6.02	-12.25	-22.51	0.974
10 DURANGO	Norte	6.45	-1.95	-3.15	-2.62	-1.36	-2.63	0.963
11 GUANAJUATO	Centro	0.00	-7.95	-10.85	-9.65	-8.70	-37.16	0.874
12 GUERRERO	Sur	-5.87	-15.44	-17.94	-17.77	-18.10	-75.12	0.985
13 HIDALGO	Centro	-2.10	-9.52	-11.13	-10.93	-12.03	-45.70	0.910
14 JALISCO	Centro	2.25	-1.17	-2.25	-3.20	-6.42	-10.79	0.998
15 MEXICO	Centro	-2.31	-9.19	-9.14	-8.44	-10.63	-39.72	0.892
16 MICHOACAN	Centro	1.49	-3.69	-3.93	-5.79	-7.87	-19.79	0.989
17 MORELOS	Centro	-2.70	-9.88	-9.64	-8.12	-11.38	-41.72	0.902
18 NAYARIT	Centro	8.82	1.44	-5.35	-6.70	-8.03	-9.81	0.908
19 NUEVO LEON	Norte	3.26	-6.41	-9.11	-7.59	-10.27	-30.12	0.786
20 OAXACA	Sur	-2.64	-12.27	-14.35	-14.06	-16.25	-59.58	0.968
21 PUEBLA	Centro	-5.24	-15.45	-14.12	-13.71	-16.00	-64.53	0.988
22 QUERETARO	Centro	-3.53	-7.64	-9.92	-10.79	-10.53	-42.42	0.942
23 QUINTANA ROO	Sur	-4.46	-15.56	-12.20	-13.68	-12.87	-58.77	0.870
24 SAN LUIS POTOSI	Norte	-1.16	-7.68	-9.52	-9.31	-13.34	-41.00	0.933
25 SINALOA	Norte	7.34	-1.77	-3.17	-4.93	-4.32	-6.85	0.864
26 SONORA	Norte	12.67	4.79	1.10	-0.48	-1.08	17.00	0.942
27 TABASCO	Sur	1.86	-8.22	-9.92	-8.32	-10.88	-35.47	0.900
28 TAMAULIPAS	Norte	3.21	-0.91	-5.29	-4.48	-4.64	-12.11	0.647
29 TLAXCALA	Centro	-8.61	-11.75	-10.84	-8.97	-12.84	-53.02	0.993
30 VERACRUZ	Centro	-2.41	-8.35	-10.01	-11.17	-11.92	-43.87	0.963
31 YUCATAN	Sur	-2.48	-13.74	-14.68	-14.61	-16.17	-61.68	0.962
32 ZACATECAS	Norte	2.40	-4.47	-6.06	-4.384	-5.96	-18.48	0.990
TOTAL		-0.86	-8.56	-9.88	-10.35	-11.76	-41.40	0.987

DISCUSION

Las curvas obtenidas con los datos observados presentaron inflexiones muy pronunciadas que corresponden a periodos diferenciados en la historia natural de la desnutrición infantil relacionados con el peso al nacer, lactancia materna, edad de ablactación, la incidencia de infecciones y parasitosis, la competencia inmunológica y sobrevivencia, entre otros factores (38-40). El análisis por segmentos de edad específica permite también modelar matemáticamente la dinámica de los periodos en los cuales el daño nutricional se presenta con mayor intensidad, lo cual puede apreciarse también a simple vista en la representación gráfica del polinomio generado a partir de los datos observados.

El índice propuesto como la integral del polinomio de

quinto grado, nos permite apreciar cualitativa y cuantitativamente la brecha que separa a las poblaciones estudiadas respecto a la población de referencia. De esta manera es posible describir los cambios ocurridos a través del tiempo, así como discriminar los contrastes que existen entre diferentes grupos poblacionales, lo cual no es posible cuando se analiza únicamente la prevalencia de desnutrición en menores de 5 años.

El índice polinomial de desnutrición infantil, permite una comparación objetiva entre diferentes encuestas y a diferentes escalas, lo cual cobra importancia en los países latinoamericanos donde se genera de manera permanente información del estado de nutrición en población infantil, a través de encuestas y programas, los cuales hasta el momento actual han permitido cuantificar y establecer algunos cambios

en el tiempo, pero sin poder establecer comparaciones consistentes entre diferentes poblaciones.

Al analizar la información de las encuestas nacionales mediante este índice, es posible apreciar los cambios importantes ocurridos en los años recientes en México, como resultado de un complejo proceso de transición, en el cual la disminución de la prevalencia nacional de desnutrición, lejos de implicar la superación de un grave problema, se presenta como un fenómeno de polarización nutricional. En el medio urbano se transita aceleradamente hacia graves problemas de sobrealimentación, en tanto que los problemas de desnutrición persisten en forma importante en el medio rural, y, en menor medida, en los sectores urbanos inferiores. Es posible identificar incluso zonas de deterioro muy importante como las regiones indígenas y el estado de Guerrero.

La identificación de grupos de riesgos es uno de los atributos más destacados de este índice, al con mayor detalle la dinámica de la desnutrición en la población menor de cinco años, no sólo diferenciando entre grupos por características sociodemográficas de relevancia epidemiológica, sino también al establecer los periodos de edad en los que se produce el deterioro nutricional o el sobrepeso en el grupo estudiado.

El índice puede ser también de utilidad para evaluar objetivamente el impacto de las intervenciones de apoyo a la nutrición, en programas que cuenten con un sistema de vigilancia longitudinal del estado de nutrición de la población atendida. Las diferencias observadas entre dos momentos a lo largo del programa permiten apreciar la evolución de la brecha nutricional en respuesta a las acciones del programa, sin necesidad de efectuar ajustes de prevalencia por estructura de población en ambos momentos.

A través de esta investigación, se observaron algunas limitaciones de este índice que es necesario tomar en cuenta. Debe cuidarse la capacidad del modelo para representar la distribución de promedios de la puntuación z de la población estudiada. En este sentido cuando la r es menor a .90 recomendamos tener cautela en la interpretación del índice. Otras precauciones deben observarse en lo referente al tamaño de la muestra y a la varianza de los grupos. Cuando la muestra es pequeña los valores promedio pueden sesgarse en forma importante si uno de los casos presenta valores z pe muy bajos o muy altos; si ello ocurre en alguno de los grupos etéreos extremos, expresado en un error estándar alto, habrá una distorsión de los valores extrapolados correspondientes a cero ó sesenta meses, lo cual puede sesgar el índice en forma importante. Por otra parte, cuando tenemos un tamaño de muestra suficientemente grande, pero se observa una varianza elevada, puede ser indicativo que estamos mezclando dos o más poblaciones con atributos diferentes, como se observa claramente en la Enurbal 95.

Sería conveniente profundizar en el análisis del

comportamiento de este índice polinomial en distintas poblaciones para establecer parámetros que permitan clasificar a las poblaciones. Si tomamos en cuenta que, a escala mundial, la mayor prevalencia observada de peso para la edad menor a $-2z$ en menores de 5 años se ubica alrededor de 50% (41), bajo el supuesto de proximidad suficiente de la media y la mediana, el promedio de $-2z$ pe en el intervalo de 0 a 60 meses equivaldría a un valor del índice de -120 , probablemente muy cercano al límite superior observable epidemiológicamente. En el presente trabajo el mayor índice encontrado, -79.28 , correspondió a la población indígena de la ENAL 89.

Pudiera ser de utilidad clasificar a las poblaciones utilizando intervalos de 25 unidades para categorías de deterioro nutricional. De esta manera pudiera caracterizarse a las poblaciones de acuerdo con la siguiente escala de deterioro: leve (-1 a -24.9), moderado (-25 a -49.9), grave (-50 a -74.9), muy grave (-75 a -99.9) y extremadamente grave (superior a -100).

Este modelo deberá validarse en función de su sensibilidad y especificidad de acuerdo con otros criterios de prevalencia del estado de nutrición, considerados como estándares convencionales.

Se concluye, que este índice es útil y presenta ventajas para la evaluación y vigilancia epidemiológica del estado de nutrición de población en riesgo nutricional, sí como para cuantificar el efecto de los programas de nutrición y los cambios ocurridos a través del tiempo en población infantil.

REFERENCIAS

1. Valiente S, Abala C, Avila B. Patología nutricional en América Latina y el Caribe Arch Latinoamer Nutr 1988 Sep;38(3):445-65.
2. De Onis M, Frongillo E, Blössner M Is malnutrition declining? An analysis of changes in levels of child malnutrition since 1980. Bull World Health Organ. 2000;78(10):1222-33.
3. Monckeberg F Campaña contra la desnutrición infantil en Chile, 1952-1977 Rev Med Chil. 1977 Oct;105(10):687-95 .
4. Riveron Corteguera R, Rios Massabot NE, Carpio Sabatela R. Infant mortality in Cuba, 1969-1988. Bull Pan Am Health Organ 1989;23(3):273-83
5. Mata LJ, Mohs E, Albertazzi C, Gutierrez R. Consideraciones acerca de la desnutrición en Centro América con especial referencia a Costa Rica Rev Biol Trop 1976 Jun;24(1 Suppl):25-39.
6. OPS .Investigaciones en salud pública. Serie de informes técnicos. Washington, D.C. 2001
7. Gómez-Saucedo T. Validación del índice nutricional en preadolescentes mexicanos con el método de sensibilidad y especificidad. Salud Pública de México, Vol.40, N°5, Septiembre-Octubre de 1998.
8. Gómez-Saucedo T. Validez diagnóstica del índice de masa corporal. en una muestra de escolares preadolescentes y

- adolescentes mexicanos. *Acta pediatr Mex* 1997;18 (3): 03-110.
9. Organización Panamericana de la Salud. Manual sobre el enfoque de riesgo en la atención materno-infantil. OPS, Washington, 1986.
 10. White JV. Risk factors for poor nutritional status. *Prime Care* 1994;21:19-31.
 11. Sermet-Gaudelus I, Poisson-Salomon AS, Colomb V, Brusset MC, Mosser F, Berrier F, Ricour C. Simple pediatric nutritional risk score to identify children at risk of malnutrition. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 64-70.
 12. Organización Panamericana de la Salud. Serie de informes técnicos sobre índices de inequidad en servicios de salud, OPS, Guatemala, 1995.
 13. Wogstaff, 1991 en OPS Serie de informes técnicos sobre índices de inequidad en servicios de salud, Guatemala. 1995.
 14. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Encuesta Nacional de Nutrición en el medio Rural ENAL-1989. México, D.F.: INNSZ, Comisión Nacional de Alimentación. 1990.
 15. Avila-Curiel A, Shamah T, Chávez A, Madrigal H. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano: análisis de las encuestas nacionales de alimentación. *Salud Pública de Méx.* 1993;35:658-666.
 16. Avila A, Shamah T, y Chavez. Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural 1996. Resultados por Entidad. Vol 1. México, D.F. Junio de 1997.
 17. Avila-Curiel A, Shamah-Levy T, Galindo-Gómez C, Rodríguez-Hernández G, Barragán-Heredia, L M. La desnutrición en el medio rural mexicano. *Salud Pública Mex* 1998; 40: 150-160.
 18. Sepúlveda J, Lezana MA, Tapia-Conyer R, Valdespino JL, Madrigal H, Kumate J. Estado nutricional de los preescolares y mujeres en México: Resultados de una encuesta nacional. *Gac Med Mex* 1990; 126:3.
 19. Rivera J, Shamah T, Villalpando S, González de Cossío T, Hernández B, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. México, Instituto Nacional de Salud Pública 2001.
 20. Avila A, Shamah T, y Chavez. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. México D.F. 1995.
 21. Habicht JP. Some characteristics of indicators of nutritional status for use in screening and surveillance. *Am J Clin Nutr* 1980; 33:531-5.
 22. Waterlow JC, Buzina R, Keller W, Lane JM, Nichaman MZ, Tanner JM. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bull World Health Organ.* 1977;55(4):489-98.
 23. Acciari G, JC Eckroad, et al. Análisis comparativo de diferentes mediciones antropométrica *Arch Latinoamer Nutr* 1977;27(3): 359-75.
 24. López de Piza E, E Piza Volio, et al. Desarrollo de una metodología para la evaluación del estado nutricional en hogares. *Arch Latinoamer Nutr* 1986;36(1): 53-66.
 25. WHO, Working Group. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Technical Report Series-854. Geneva. 1995.
 26. Organización Mundial de la Salud. Medición del Cambio del Estado Nutricional. NCHS-OMS. Ginebra, 1983.
 27. Victora CG. The association between wasting and stunting: an international perspective. *J Nutr* 1992 May;122(5):1105-10.
 28. Dibley MJ, Goldsby JB, Staehling NW, Trowbridge FL. Development of normalized curves for the international growth reference: historical and technical considerations. *Am J Clin Nutr* 1987; 46:736-48
 29. Dibley MJ, Staehling N, Nieburg P, Trowbridge FL. Interpretation of Z-score anthropometric indicators derived from the international growth reference. *Am J Clin Nutr.* 1987; 46:749-462
 30. Cora LA, Post and Cesar G. Victora The low prevalence of weight-for-height deficits in Brazilian children is related to body proportions *J Nutr.* 2001;131:1290-1296.)
 31. Tanner JM, Hayashi T, Preece MA, Cameron N. Increase in length of leg relative to trunk in Japanese children and adults from 1957 to 1977: comparison with British and with Japanese Americans. *Ann. Hum. Biol.* 1982;9:411-424
 32. Mora JO. A new method for estimating a standardized prevalence of child malnutrition from anthropometric indicators. *Bulletin of the World Health Organization* 1989; 67(2):133-142
 33. Cálculo directo a partir de las bases de datos de la ENAL 96. No publicado.
 34. Organización Mundial de la Salud. Medición del Cambio del Estado Nutricional. NCHS-OMS. Ginebra, 1983
 35. Shrimpton R, Victora C, De Onis M, Costa-Lima R, Blössner M, Clugston G. Worldwide Timing of Growth Faltering: Implications for Nutritional Interventions *Pediatrics* 2001. 107(5) e75.
 36. Hayman D. CurveExpert 1.34. A curve fittings System for Windows, 1997 <http://www.ebicom.net/~dhyams/cvxpt.htm>
 37. México Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. XI Censo Nacional de Población y Vivienda. Resumen General, México 1992 .
 38. Chávez A, Martínez C, Yashine T. Nutrition, behavioral development and mother-child interaction in young rural children. *Fed Proc* 1975;34:1574-1586.
 39. Chandra RK. Nutrition, Immunity and Infection: present knowledge and future directions. *Lancet* 1983; 1:688-691.
 40. Pelletier DL, Frongillo E, Habicht J-P. Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. *Am J Public Health* 1993;83:1130-1133.si
 41. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Estado Mundial de la Infancia 2001. Unicef, Nueva York. 2001 pp 82-85.

Recibido: 14-05-2003

Aceptado: 13-10-2003

Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos

Larissa Ribeiro Braga, Maria Alice Rostom de Mello, Claudio Alexandre Gobatto

Departamento de Educação Física, I.B., Universidade Estadual Paulista-UNESP- Brasil

RESUMO. O exercício contínuo tem sido recomendado na prevenção e no tratamento da obesidade mas o emprego do exercício intermitente é discutível. No presente estudo, são apresentados resultados referentes à composição química corporal de ratos obesos submetidos ao treinamento contínuo e intermitente e subsequente destreinamento. Foram utilizados ratos, Wistar, recém-nascidos, que receberam glutamato monossódico (MSG), via subcutânea, 4mg/g peso corporal (p.c.), a cada dois dias nos primeiros 14 dias de vida. Após o desmame, foram separados em 3 grupos: MSG-SED (sedentário), MSG-CONT (contínuo=natação, 45 min/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga de 5% p.c. por 10 semanas) e MSG-INT (intermitente= natação, 15s de atividade/15s de repouso, num total de 45min, 5 dias/semana, com sobrecarga de 15% p.c.). Como controles foram utilizados ratos que receberam salina (SAL) separados em 3 grupos: SAL-SED, SAL-CONT e SAL-INT. Os animais foram avaliados imediatamente após 10 semanas de treinamento e 8 semanas depois de sua interrupção. Os ratos MSG mostraram maiores teores de gordura na carcaça bem como peso e tamanho celular no tecido adiposo epididimal que os SAL, comprovando a eficácia da droga em causar obesidade. O treinamento intermitente atenuou o acúmulo de lactato durante o exercício nos ratos SAL e MSG em relação aos sedentários, indicando melhora do condicionamento aeróbio. Ambos os protocolos reduziram o ganho de peso dos ratos SAL e MSG e o teor de gordura da carcaça dos ratos MSG. Os efeitos dos dois protocolos foram transitórios, uma vez que após o destreinamento os benefícios observados foram revertidos.

Palavras chave: Obesidade, exercício, treinamento contínuo, treinamento intermitente, controle de peso.

SUMMARY. Continuous and intermittent exercise: effects of training and detraining on body fat in obese rats. Exercise training is often recommended in prevention and treatment of obesity. The present study was designed to compare the effects of intermittent and continuous exercise on weight loss and carcass composition in obese rats. Obese male Wistar rats (monosodium glutamate [MSG] administration, 4 mg/g of body weight every other day from birth to 14 days old) were used. After drug administration, the rats were separated into three groups: MSG-SED (sedentary), MSG-CONT (continuous, swimming, 45 min/day, 5 days/week, with and overload of 5% body weight for 12 weeks) and MSG-INT (intermittent, 15s swimming intermitted by 15s rest, during 45 min, 5 days/week, with and overload of 15% body weight for 12 weeks). Rats of the same age and strain, administered with saline were used as control (SAL), and subdivided into three groups: SAL-SED, SAL-CONT and SAL-INT. The animals were evaluated at the 10 weeks of training and 8 weeks of its interruption. MSG rats showed higher carcass fat as well as weight and cell size in epididymal adipose tissue than SAL rats, indicting the efficacy of the drug in producing obesity. Intermittent training protocol led to a reduction in blood lactate accumulation during acute exercise and both protocols reduced body weight gain during the experiment in MSG rats. After 8 weeks of training interruption no differences were observed among groups in the examined parameters. Only intermittent exercise training improved aerobic fitness but both protocols were similarly efficient in determining weight loss. However, the effects were transitory, since they disappeared after detraining.

Key words: Obesity, exercise, intermittent exercise, continuous exercise and weight loss.

INTRODUÇÃO

Vários modelos de obesidade experimental têm sido propostos a fim de investigar aspectos metabólicos e hormonais envolvidos nesse quadro, aos níveis celular e molecular. A grande diversidade de características entre eles indica que nenhum isoladamente pode servir de modelo geral para a obesidade humana (1). Independentemente dessa questão, os estudos em modelos animais têm sido bastante úteis no estabelecimento das causas e conseqüências da doença e podem, também, ter importante participação no

desenvolvimento de procedimentos mais efetivos para prevenção e tratamento.

Muitos tipos de obesidade animal já foram classificados de acordo com sua etiologia. Entre os modelos neurais, a obesidade hipotalâmica é a mais bem conhecida. Existem diferentes maneiras de indução da obesidade hipotalâmica, inclusive através de injeções sistêmicas de glutamato monossódico. Animais tratados com essa droga apresentam redução do crescimento corporal, intolerância à glicose, resistência à insulina, entre outras alterações (1).

O exercício físico, por sua vez, tem sido amplamente

empregado isoladamente ou em associação com dietoterapia, no tratamento da obesidade. Embora a utilização do treinamento contínuo, de caráter aeróbio seja mais difundida, o treinamento intervalado, segundo alguns autores, também pode ser útil em programas de redução ponderal, uma vez que parece induzir maiores adaptações metabólicas e ser facilmente sustentado por tempos prolongados com elevada intensidade de esforço (2). Além disso, apresenta grande aderência ao regime de exercício por parte dos participantes (3). Existem poucas informações quanto ao uso do exercício na prevenção da obesidade e são raros os estudos comparativos entre os efeitos de programas contínuos e intermitentes sobre a gordura corporal. Mais raras, ainda, são as pesquisas que abordam os efeitos do destreinamento sobre esse parâmetro.

Em face do exposto, o presente estudo foi delineado com o objetivo de comparar os efeitos de programas de treinamento físico contínuo e intermitente e do subsequente destreinamento, sobre a adiposidade corporal de ratos jovens com obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG).

METODOS

Animais e seu tratamento

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, recém nascidos. Após o desmame, foram mantidos em gaiolas coletivas, não excedendo quatro animais por gaiola, em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e ao alimento (ração comercial para roedores). Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados em conformidade com a regulamentação sobre o assunto vigente no país.

Delineamento e grupos experimentais

O experimento ocorreu em três etapas. Na primeira (indução da obesidade), os animais recém nascidos foram separados em dois grupos de 40 ratos em cada um:

- **Salina (SAL):** receberam solução fisiológica (NaCl 0,9%) via subcutânea a cada 2 dias nos primeiros 14 dias de vida.
- **Glutamato Monossódico (MSG):** receberam glutamato monossódico via subcutânea, na dose de 4.0 mg/g de peso corporal a cada 2 dias nos primeiros 14 dias de vida. Após o desmame, que ocorreu aos 21 dias de idade, teve início a segunda etapa (treinamento físico), onde os animais foram distribuídos nos seguintes grupos, com 20 ratos em cada um.
- **Salina Sedentário (SAL-SED):** animais que receberam solução fisiológica nos primeiros 14 dias de vida e que não foram submetidos ao treinamento físico.
- **Salina Contínuo (SAL-CONT):** animais que receberam salina nos 14 primeiros dias de vida e que foram submetidos ao protocolo de treinamento contínuo.

- **Salina Intermitente (SAL-INT):** animais que receberam salina nos primeiros 14 dias de vida e que foram submetidos ao protocolo de treinamento intervalado.
- **MSG Sedentário (MSG-SED):** animais que receberam doses de MSG nos 14 dias de vida e que não foram submetidos ao treinamento físico.
- **MSG Contínuo (MSG-CONT):** animais que receberam doses de MSG nos 14 dias de vida e que foram submetidos ao protocolo de treinamento contínuo.
- **MSG Intermitente (MSG-INT):** animais que receberam doses de MSG nos 14 dias de vida e que foram submetidos ao protocolo de treinamento intervalado.

Após 10 semanas do início do protocolo de exercício, metade dos animais de cada grupo foi sacrificado. Todos os animais restantes foram mantidos inativos por mais 8 semanas (terceira etapa-destreinamento) quando então foram sacrificados. Ao final das 2ª etapa, antes do sacrifício, animais dos grupos sedentários e treinados foram submetidos a um teste de esforço para avaliação dos teores de lactato sanguíneo. Após o sacrifício, ao final das 2ª e 3ª etapas, foram avaliados: composição química da carcaça, tamanho e número de células no tecido adiposo epididimal.

Protocolos de treinamento

O programa contínuo consistiu de 45 minutos de natação com sobrecarga de 5% do peso corporal do animal, cinco dias por semana, durante 12 semanas consecutivas, em tanque de 100 x 70 x 60 cm, contendo água mantida a 32±1° C.

O programa intervalado constituiu de tempo total de 45 minutos de natação sendo alterando 15 segundos de trabalho suportando sobrecarga de 15% do peso corporal, com 15 segundos de repouso, cinco dias por semana, durante 12 semanas, em tanque de 100 x 70 x 60 cm, contendo água mantida a 32±1°C. Antes do início dos programas com as respectivas cargas, os animais de cada programa passaram por um período de uma semana de adaptação, utilizando cargas inferiores, que foram incrementadas gradativamente até atingirem as cargas propostas.

Avaliações anteriores ao sacrifício dos animais

Teste de esforço físico

Animais dos grupos SAL-SED, SAL-CONT, MSG-SED e MSG-CONT foram submetidos a 30 minutos de natação com sobrecarga de 5% do peso corporal e foram coletadas amostras sanguíneas antes e após 10, 20, 30 minutos de exercício para dosagem dos teores de lactato em analisador eletroquímico. Ratos dos grupos SAL-SED, SAL-INT, MSG-SED e MSG-INT foram submetidos a 15 segundos de natação com sobrecarga de 15% do peso corporal intercalados com 15 segundos de repouso num total de 30 minutos, e foram

coletadas amostras sanguíneas de sangue antes e após 10, 20, 30 minutos para dosagem de lactato em analisador eletroquímico (4).

Avaliações gerais

Todos os animais foram pesados e medidos (focinho-ânus) uma vez por semana para a determinação do ganho de peso e de comprimento corporais, respectivamente, durante o período experimental. A ingestão alimentar dos animais foi registrada, uma vez por semana através da diferença entre a quantidade de alimento ofertada num dia e a quantidade restante no comedouros no dia seguinte.

Avaliações após o sacrifício dos animais

Composição química da carcaça

Após sacrifício, as carcaças foram evisceradas, pesadas e secas até peso em estufa a 100°C. Foram então homogeneizadas em liquidificador com benzeno sofrendo várias lavagens com esse solvente para a remoção da gordura. A carcaça livre de gordura foi seca até peso constante em estufa a 100°C. O pó seco e desengordurado foi pesado. O conteúdo de gordura e de H₂O foi calculado por diferença de peso. Uma alíquota do pó desengordurado foi dissolvida em HClO₄ 1 N e o teor de proteína, medido pelo método folin-fenol (5).

Tamanho e número de células no tecido adiposo epididimal

O tecido adiposo epididimal foi totalmente removido, pesado e teve seu teor de DNA avaliado (6), visando inferir sobre o tamanho (razão peso/DNA) e número (teor de DNA) de células nesse tecido (7).

Análise estatística

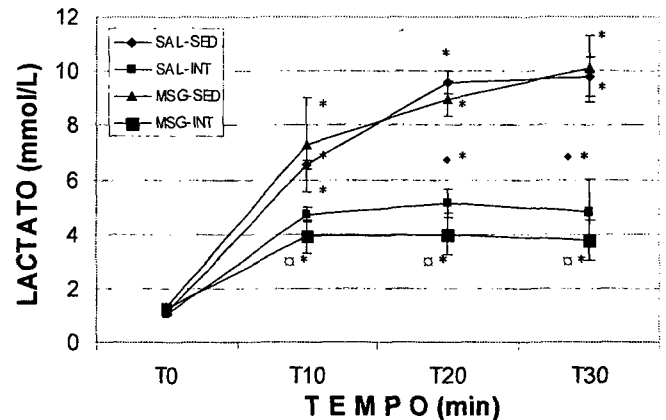
Foi realizada através da análise de variância de duas entradas, sendo avaliados os efeitos da obesidade experimental e do treinamento físico. Quando necessário foi utilizado o teste "pos-hoc" de Newman-Keuls para a comparação entre os grupos em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5%.

RESULTADOS

O acúmulo de lactato sanguíneo durante o teste de esforço nos ratos SAL e MSG foi menor nos ratos submetidos ao programa de exercício intermitente em relação aos ratos sedentários (Figura 1). Não foram constatadas diferenças significativas nos níveis de lactato durante o exercício entre ratos treinados pelo protocolo contínuo e os sedentários (Figura 2).

FIGURA 1

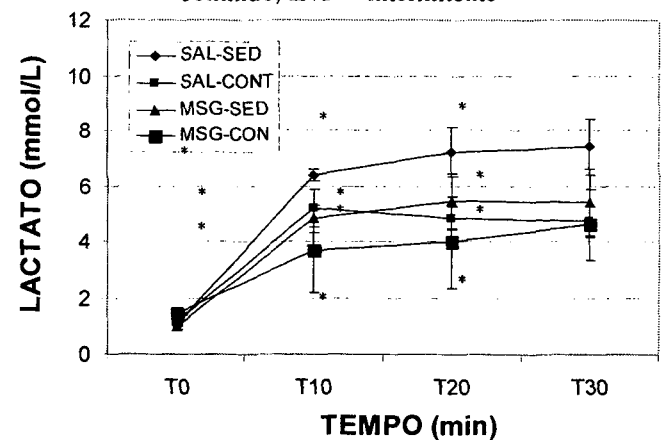
Lactato no sangue (mmol/L) dos ratos durante teste de esforço realizado após o período de treinamento físico de caráter intermitente. Resultados expressos como média \pm EPM de 8 ratos em cada grupo. SAL = salina, MSG = glutamato monossódico, SED = sedentário, INT = intermitente



- ♦ Diferença significativa (ANOVA $p < 0.05$) em relação a: SAL-SED,
- α Diferença significativa (ANOVA $p < 0.05$) em relação a: MSG-SED
- * Diferença significativa (ANOVA $p < 0.05$) em relação aos teores basais (tempo 0).

FIGURA 2

Lactato no sangue (mmol/L) dos ratos durante teste de esforço realizado após o período de treinamento físico de caráter contínuo. Resultados expressos como média \pm EPM de 8 ratos em cada grupo. SAL = salina, MSG = glutamato monossódico, SED = sedentário, CONT = contínuo, INT = intermitente



- * Diferença significativa (ANOVA $p < 0.05$) em relação aos teores basais (tempo 0).

Os animais submetidos aos dois protocolos de treinamento físico também apresentaram menor ganho de peso que os sedentários na etapa de treinamento. Nesta etapa, os valores referentes ao ganho de peso dos ratos MSG foram significativamente inferiores em relação aos animais

controles equivalentes. Na etapa de destreino, apenas os ratos MSG-S mantiveram menor ganho de peso que os demais (Tabela 1). Menor comprimento corporal também foi observado em animais tratados com MSG (Tabela 2).

TABELA 1
Ganho de peso (g) durante os períodos de treinamento e destreino

SAL-SED	SAL-CONT	Treinamento			
		SAL-INT	MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
309,1± 7,36	254,00± 6,30*	276,50± 8,03**	240,40± 9,66*	200,80± 7,75**	202,00± 8,10#
Destreino					
125,6± 16,00	143,9± 19,70	104,5± 15,50	87,90± 3,70*	102,40± 13,00†	106,4± 11,51‡

a: Resultados expressos como média ± EPM de 20 ratos por grupo na fase de treinamento e 10 na fase de destreino. SAL = salina, MSG = glutamato monossódico, SED = sedentário, CONT = contínuo, INT = intermitente. Diferença significativa (ANOVA p< 0.05) em relação *SAL-SED, † SAL-CONT, **SAL-INT, ‡MSG-SED.

TABELA 2
Comprimento corporal (cm) ao final dos períodos de treinamento e destreino.

SAL-SED	SAL-CONT	Treinamento			
		SAL-INT	MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
23,91± 0,32	22,95± 0,30	23,24± 0,29	21,61± 0,24*	21,28± 0,24*	20,95± 0,14#
Destreino					
23,10± 0,44	25,00± 0,10	25,80± 0,17	23,28± 0,45*	22,88± 0,33*	22,70± 0,24#

Resultados expressos como média ± EPM de 20 ratos por grupo na fase de treinamento e 10 na fase de destreino. As siglas são as mesmas constantes da Tabela 1. Diferença significativa (ANOVA p< 0.05) em relação a: *SAL-SED, †SAL-CONT, # SAL-INT

Os animais MSG mostraram valores significativamente superiores em relação aos teores de gordura na carcaça durante todo o período experimental (treinamento e destreino) comparado aos grupos controle salina correspondentes. (Tabela 3), sem qualquer alteração no consumo alimentar (Tabela 4). O teor de gordura na carcaça dos MSG treinados foi menor que os sedentários durante a etapa de treinamento. Em ambas as etapas do protocolo experimental, os ratos tratados com MSG apresentaram teores de água significativamente inferiores aos ratos salina correspondentes (Tabela 3).

O peso do tecido adiposo epididimal foi sempre

significativamente mais elevado nos grupos MSG que nos SAL. Os valores observados entre os MSG treinados foram menores que os dos sedentários, logo após a etapa de treinamento. Em ambas as etapas (treinamento e destreino) nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao número de células adiposas, conforme inferido pelo teor de DNA. Os ratos MSG apresentaram logo após a fase de treinamento valores no tamanho celular, conforme inferido pela razão peso do tecido/DNA, significativamente superiores em relação aos SAL equivalentes. Tais alterações permaneceram logo após a fase de destreino (Tabela 5).

TABELA 3
Teores de água (g/100g), de gordura (g/100g) e proteína (g/100g) na carcaça dos ratos após treinamento físico e subsequente destreino.

Grupos	Treinamento					
	SAL-SED	SAL-CONT	SAL-INT	MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
Água	65,17± 0,65	58,93± 3,00	61,38± 2,75	49,29± 3,27*	51,66± 3,44+	50,91±0,87#
Gordura	8,74± 0,91	13,22± 2,80	10,76± 2,24	27,11± 4,75*	21,41± 2,46 ^{td}	20,91± 0,89#
Proteína	9,49± 0,66	12,91± 2,44	13,67±4,56	8,36± 0,76	9,37± 0,70	11,39± 1,58
Destreino						
Água	63,89± 0,21	60,61± 0,37	63,18± 0,48	48,51± 2,73*	46,37± 3,13+	44,20± 4,40#
Gordura	8,44± 0,95	10,19±0,37	7,76± 0,70	27,10± 1,18*	29,63± 2,28+	25,14± 2,07#
Proteína	11,85± 1,15	9,12± 0,76	10,63± 0,82	12,34± 1,14	13,10± 0,37	11,65± 3,32

Resultados expressos como média ± EPM de 8 ratos por grupo. As siglas são as mesmas constantes do Tabela 1. Diferença significativa (ANOVA p< 0.05) em relação a: *SAL-SED, +SAL-CONT, #SAL-INT, ^{td}MSG-SED.

TABELA 4
Ingestão alimentar (g/100g/dia) durante os períodos de treinamento e destreino

SAL-SED	Treinamento				
	SAL-CONT	SAL-INT	MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
7,78±0,07	8,64± 1,16	8.15± 0,20	7,53± 0,18	8,76± 0,57	8,14± 0,49
Destreino					
6.45± 025	6,00±0,20	5.80± 0,21	6,50±,041	5,90± 0,80	7,15± 0,55

Resultados expressos como média ± EPM padrão de 20 ratos por grupo na fase de treinamento e 10 na fase de destreino. As siglas são as mesmas constantes da Tabela 1.

TABELA 5
Peso (mg/100mg de peso corporal), teor de DNA (mg/100mg de tecido) e razão peso/DNA (x 10²) do tecido adiposo epididimal dos ratos após treinamento físico e subsequente destreino

Treinamento Grupos	Destreino					
	SAL-SED	SAL-CONT	SAL-INT	MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
Peso	300,53± 13,41	324,47± 19,20	296,38± 25,63	916,88± 33,75*	878,21± 13,10 ^{td}	780,78± 84,71#
DNA	0,025± 0,0029	0,021± 0,0012	0,019± 0,0020	0,019± 0,0025	0,018± 0,0021	0,018± 0,0024
Peso/DNA	120,05± 30,95	154,38± 37,76	155,78± 42,12	482,86± 69,76*	487,76± 73,01+	433,93± 93,13#
Destreino						
Peso	344,64± 30,07	570,88± 108,46	426,31± 47,36	900,75± 105,36*	1107,64± 165,23+	1048,19± 87,00#
DNA	0,0082±0,00074	0,0088± 0,00095	0,0094± 0,0017	0,0081± 0,0015	0,0082± 0,0012	0,0084± 0,0012
Peso/DNA	420.73± 148,70	648,86± 51,55	486,19± 86,72	1112.34±319,15*	1350,54± 71,14+	1262.97± 124,83#

Resultados expressos como média ± EPM de 5 a 8 ratos por grupo. As siglas são as mesmas constantes do Tabela 1. Diferença significativa (ANOVA p< 0.05) em relação a: *SAL-SED, +SAL-CONT, #SAL-INT, ^{td}MSG-SED

DISCUSSÃO

O exercício físico, sabidamente, exerce uma série de efeitos benéficos à saúde e por isso tem sido amplamente indicado para programas de controle ponderal. Entre os efeitos esperados da prática constante de exercícios, acha-se a melhoria do condicionamento físico. A utilização do lactato sanguíneo como indicador do estado de condicionamento aeróbio vem ganhando forte impulso nos últimos anos (8). No presente estudo o programa de treinamento intermitente reduziu o acúmulo de lactato sanguíneo nos ratos SAL e MSG durante o teste de esforço físico. Isto indica a eficácia desse protocolo de treinamento físico em promover melhoria do condicionamento nesses animais (4). Redução no acúmulo de lactato sanguíneo deve-se principalmente a maior capacidade de remoção de lactato do sangue promovido pelo treinamento (9). Entretanto, em nenhum dos grupos treinados pelo protocolo contínuo (SAL e MSG) houve qualquer diferença significativa entre animais sedentários e treinados. Em conjunto esses resultados sugerem maior eficácia do protocolo intermitente em comparação ao contínuo na melhoria do condicionamento físico.

Os animais tratados com glutamato monossódico (MSG) no presente estudo apresentaram peso corporal e estatura (comprimento focinho-ânus) menores que os controles equivalentes e deposição anormal de gordura na carcaça, a despeito da ingestão alimentar semelhante, confirmando dados anteriores da literatura (10,11). Os animais MSG mostraram valores significativamente superiores em relação aos teores de gordura na carcaça e ao peso do tecido adiposo epididimal em ambas as etapas do experimento (treinamento e destreinamento) comparados aos grupos controles correspondentes. Isto também foi observado em outros estudos utilizando roedores tratados com MSG (10,11). Segundo alguns autores, animais MSG apresentam menor atividade da lipase hormônio sensível (enzima responsável pela lipólise) e menor expressão de seu mRNA no tecido adiposo. Além disso, número de receptores de insulina, síntese de lipídeos e translocação celular de GLUT-4 acham-se mais elevados nos adipócitos de ratos MSG que controles (11). Por outro lado, NASCIMENTO et alii (12) constataram que roedores tratados com MSG apresentam aos 90 dias de idade aumento da lipogênese associado à diminuição do conteúdo de GLUT-4. De qualquer forma, o acúmulo excessivo de tecido adiposo nos animais MSG parece estar relacionado a um desbalanço entre respostas lipolíticas e atividades lipogênicas.

Tem sido relatado que animais tratados com MSG são hipoativos e o desenvolvimento da obesidade nestes foi relacionada ao menor gasto energético em certos períodos do dia (13). A obesidade nesses animais tem sido associada também a um aumento da eficiência alimentar (14). Animais MSG usualmente apresentam menor temperatura corporal e

menor taxa metabólica basal que animais eutróficos (15). Além disso, de acordo com diferentes autores, o desenvolvimento da obesidade em ratos tratados com MSG no período neonatal, ocorre na ausência de hiperfagia (11,13,16), fato este que foi comprovado no presente estudo.

Menores comprimento e peso corporais em animais tratados com MSG em relação aos controles também foram relatados em alguns estudos prévios nos quais a expressão do mRNA do hormônio do crescimento estava reduzido associado a uma diminuição do metabolismo protéico (11). A redução do comprimento explica o menor peso corporal dos animais MSG em comparação aos controles, a despeito do maior acúmulo de gordura na carcaça.

Em resumo, nossos resultados no que tange ao acúmulo de gordura na carcaça e ao crescimento corporal indicam que, no presente estudo, o desenvolvimento da obesidade induzida pelo MSG processou-se conforme descrito na literatura.

Em ambas etapas do presente estudo (treinamento e destreinamento) nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao número de células adiposas, conforme indicado pelo teor de DNA, no tecido adiposo epididimal. Por outro lado, os ratos MSG apresentaram, logo após as fases de treinamento e destreinamento, valores no tamanho celular conforme inferido pela razão peso do tecido/DNA, significativamente superiores em relação aos SAL equivalentes. Em ratos, o peso dos órgãos e o teor de proteína continuam a aumentar até os 100 dias de idade. Em contraste, o DNA atinge um máximo antes em muitos órgãos (7). No tecido adiposo, o DNA atinge um aumento máximo aos 90 dias de idade (16). Alterações metabólicas durante o período do crescimento hiperplásico podem resultar em número alterado das células no tecido adiposo. O tratamento neonatal com MSG provavelmente não alterou o número de células mas aumentou o tamanho destas no tecido adiposo. Estudos anteriores indicam que a obesidade induzida por MSG é do tipo hipertrófica uma vez que tais animais mostraram menor teor de DNA associado a uma maior razão proteína/DNA (11, 17).

Nenhuma diferença significativa foi observada no conteúdo de proteína na carcaça dos animais MSG e SAL. O teor de água, por sua vez, mostrou-se significativamente menor nos animais MSG. Uma série de estudos mostrou redução no conteúdo de proteína e água em animais tratados com MSG (18,13). Alguns estudos prévios indicaram teor reduzido de proteína na carcaça nos ratos MSG sedentários (19) resultado de uma redução do mRNA do hormônio do crescimento e lentificação do metabolismo protéico.

O teor de gordura na carcaça dos animais MSG treinados foi menor que os sedentários após a etapa de treinamento, confirmando resultados obtidos por COUTO (20). Esse achado foi reforçado pela constatação da redução do peso

TABELA 3
Teores de água (g/100g), de gordura (g/100g) e proteína (g/100g) na carcaça dos ratos após treinamento físico e subsequente destreinamento.

Grupos	Treinamento					
	SAL-SED	SAL-CONT	SAL-INT	MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
Água	65,17± 0,65	58,93± 3,00	61,38± 2,75	49,29± 3,27*	51,66± 3,44*	50,91± 0,87*
Gordura	8,74± 0,91	13,22± 2,80	10,76± 2,24	27,11± 4,75*	21,41± 2,46 nd	20,91± 0,89 [#]
Proteína	9,49± 0,66	12,91± 2,44	13,67± 4,56	8,36± 0,76	9,37± 0,70	11,39± 1,58
Destreinamento						
Água	63,89± 0,21	60,61± 0,37	63,18± 0,48	48,51± 2,73*	46,37± 3,13*	44,20± 4,40 [#]
Gordura	8,44± 0,95	10,19± 0,37	7,76± 0,70	27,10± 1,18*	29,63± 2,28*	25,14± 2,07 [#]
Proteína	11,85± 1,15	9,12± 0,76	10,63± 0,82	12,34± 1,14	13,10± 0,37	11,65± 3,32

Resultados expressos como média ± EPM de 8 ratos por grupo. As siglas são as mesmas constantes do Tabela 1. Diferença significativa (ANOVA $p < 0.05$) em relação a: *SAL-SED, *SAL-CONT, *SAL-INT, *MSG-SED.

TABELA 4
Ingestão alimentar (g/100g/dia) durante os períodos de treinamento e destreinamento

SAL-SED	SAL-CONT	SAL-INT	Treinamento		
			MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
7,78± 0,07	8,64± 1,16	8,15± 0,20	7,53± 0,18	8,76± 0,57	8,14± 0,49
Destreinamento					
6,45± 0,25	6,00± 0,20	5,80± 0,21	6,50± 0,41	5,90± 0,80	7,15± 0,55

Resultados expressos como média ± EPM padrão de 20 ratos por grupo na fase de treinamento e 10 na fase de destreinamento. As siglas são as mesmas constantes da Tabela 1.

TABELA 5
Peso (mg/100mg de peso corporal), teor de DNA (mg/100mg de tecido) e razão peso/DNA ($\times 10^2$) do tecido adiposo epididimal dos ratos após treinamento físico e subsequente destreinamento

Treinamento Grupos	Treinamento					
	SAL-SED	SAL-CONT	SAL-INT	MSG-SED	MSG-CONT	MSG-INT
Peso	300,53± 13,41	324,47± 19,20	296,38± 25,63	916,88± 33,75*	878,21± 13,10 nd	780,78± 84,71 [#]
DNA	0,025± 0,0029	0,021± 0,0012	0,019± 0,0020	0,019± 0,0025	0,018± 0,0021	0,018± 0,0024
Peso/DNA	120,05± 30,95	154,38± 37,76	155,78± 42,12	482,86± 69,76*	487,76± 73,01*	433,93± 93,13 [#]
Destreinamento						
Peso	344,64± 30,07	570,88± 108,46	426,31± 47,36	900,75± 105,36*	1107,64± 165,23*	1048,19± 87,00 [#]
DNA	0,0082± 0,00074	0,0088± 0,00095	0,0094± 0,0017	0,0081± 0,0015	0,0082± 0,0012	0,0084± 0,0012
Peso/DNA	420,73± 148,70	648,86± 51,55	486,19± 86,72	1112,34± 319,15*	1350,54± 71,14*	1262,97± 124,83 [#]

Resultados expressos como média ± EPM de 5 a 8 ratos por grupo. As siglas são as mesmas constantes do Tabela 1. Diferença significativa (ANOVA $p < 0.05$) em relação a: *SAL-SED, *SAL-CONT, *SAL-INT, *MSG-SED.

DISCUSSÃO

O exercício físico, sabidamente, exerce uma série de efeitos benéficos à saúde e por isso tem sido amplamente indicado para programas de controle ponderal. Entre os efeitos esperados da prática constante de exercícios, acha-se a melhoria do condicionamento físico. A utilização do lactato sanguíneo como indicador do estado de condicionamento aeróbio vem ganhando forte impulso nos últimos anos (8). No presente estudo o programa de treinamento intermitente reduziu o acúmulo de lactato sanguíneo nos ratos SAL e MSG durante o teste de esforço físico. Isto indica a eficácia desse protocolo de treinamento físico em promover melhoria do condicionamento nesses animais (4). Redução no acúmulo de lactato sanguíneo deve-se principalmente a maior capacidade de remoção de lactato do sangue promovido pelo treinamento (9). Entretanto, em nenhum dos grupos treinados pelo protocolo contínuo (SAL e MSG) houve qualquer diferença significativa entre animais sedentários e treinados. Em conjunto esses resultados sugerem maior eficácia do protocolo intermitente em comparação ao contínuo na melhoria do condicionamento físico.

Os animais tratados com glutamato monossódico (MSG) no presente estudo apresentaram peso corporal e estatura (comprimento focinho-ânus) menores que os controles equivalentes e deposição anormal de gordura na carcaça, a despeito da ingestão alimentar semelhante, confirmando dados anteriores da literatura (10,11). Os animais MSG mostraram valores significativamente superiores em relação aos teores de gordura na carcaça e ao peso do tecido adiposo epididimal em ambas as etapas do experimento (treinamento e destreinamento) comparados aos grupos controles correspondentes. Isto também foi observado em outros estudos utilizando roedores tratados com MSG (10,11). Segundo alguns autores, animais MSG apresentam menor atividade da lipase hormônio sensível (enzima responsável pela lipólise) e menor expressão de seu mRNA no tecido adiposo. Além disso, número de receptores de insulina, síntese de lipídeos e translocação celular de GLUT-4 acham-se mais elevados nos adipócitos de ratos MSG que controles (11). Por outro lado, NASCIMENTO et alii (12) constataram que roedores tratados com MSG apresentam aos 90 dias de idade aumento da lipogênese associado à diminuição do conteúdo de GLUT-4. De qualquer forma, o acúmulo excessivo de tecido adiposo nos animais MSG parece estar relacionado a um desbalanço entre respostas lipolíticas e atividades lipogênicas.

Tem sido relatado que animais tratados com MSG são hipoativos e o desenvolvimento da obesidade nestes foi relacionada ao menor gasto energético em certos períodos do dia (13). A obesidade nesses animais tem sido associada também a um aumento da eficiência alimentar (14). Animais MSG usualmente apresentam menor temperatura corporal e

menor taxa metabólica basal que animais eutróficos (15). Além disso, de acordo com diferentes autores, o desenvolvimento da obesidade em ratos tratados com MSG no período neonatal, ocorre na ausência de hiperfagia (11,13,16), fato este que foi comprovado no presente estudo.

Menores comprimento e peso corporais em animais tratados com MSG em relação aos controles também foram relatados em alguns estudos prévios nos quais a expressão do mRNA do hormônio do crescimento estava reduzido associado a uma diminuição do metabolismo protéico (11). A redução do comprimento explica o menor peso corporal dos animais MSG em comparação aos controles, a despeito do maior acúmulo de gordura na carcaça.

Em resumo, nossos resultados no que tange ao acúmulo de gordura na carcaça e ao crescimento corporal indicam que, no presente estudo, o desenvolvimento da obesidade induzida pelo MSG processou-se conforme descrito na literatura.

Em ambas etapas do presente estudo (treinamento e destreinamento) nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao número de células adiposas, conforme indicado pelo teor de DNA, no tecido adiposo epididimal. Por outro lado, os ratos MSG apresentaram, logo após as fases de treinamento e destreinamento, valores no tamanho celular conforme inferido pela razão peso do tecido/DNA, significativamente superiores em relação aos SAL equivalentes. Em ratos, o peso dos órgãos e o teor de proteína continuam a aumentar até os 100 dias de idade. Em contraste, o DNA atinge um máximo antes em muitos órgãos (7). No tecido adiposo, o DNA atinge um aumento máximo aos 90 dias de idade (16). Alterações metabólicas durante o período do crescimento hiperplásico podem resultar em número alterado das células no tecido adiposo. O tratamento neonatal com MSG provavelmente não alterou o número de células mas aumentou o tamanho destas no tecido adiposo. Estudos anteriores indicam que a obesidade induzida por MSG é do tipo hipertrófica uma vez que tais animais mostraram menor teor de DNA associado a uma maior razão proteína/DNA (11, 17).

Nenhuma diferença significativa foi observada no conteúdo de proteína na carcaça dos animais MSG e SAL. O teor de água, por sua vez, mostrou-se significativamente menor nos animais MSG. Uma série de estudos mostrou redução no conteúdo de proteína e água em animais tratados com MSG (18,13). Alguns estudos prévios indicaram teor reduzido de proteína na carcaça nos ratos MSG sedentários (19) resultado de uma redução do mRNA do hormônio do crescimento e lentificação do metabolismo protéico.

O teor de gordura na carcaça dos animais MSG treinados foi menor que os sedentários após a etapa de treinamento, confirmando resultados obtidos por COUTO (20). Esse achado foi reforçado pela constatação da redução do peso

do tecido adiposo epididimal nos animais MSG treinados em relação aos sedentários Segundo alguns autores, o exercício físico promove elevação da lipólise no tecido adiposo pela ação de hormônios lipolíticos (glucagon, adrenalina, noradrenalina, glicocorticóides e GH) que são liberados durante o exercício de longa duração. Quanto mais intenso for o exercício, maiores os níveis séricos de catecolaminas (21) o saldo negativo no balanço energético e o gasto energético em repouso (2). Além disso, a carga de trabalho pode induzir alterações agudas na temperatura corporal que desencadeiam respostas termorregulatórias mais duradouras (22).

O treinamento intermitente talvez favoreça maior gasto energético pós-exercício por manter a taxa metabólica de repouso em níveis elevados por um longo período (23). Nesse período, a gordura proveniente do tecido adiposo constitui o principal substrato consumido pelo organismo, reduzindo assim o conteúdo lipídico corporal. O menor conteúdo lipídico dos animais MSG submetidos ao treinamento físico parece ter sido responsável pelo menor ganho de peso corporal alcançado por esses animais. Por outro lado, esperava-se que o treinamento físico tivesse favorecido redução do conteúdo lipídico corporal nos animais SAL o que não ocorreu, embora esses tenham apresentado redução do ganho de peso.

Um achado que merece destaque, embora não seja o principal foco do presente estudo, é que ambos os protocolos de treinamento físico melhoraram o crescimento linear dos ratos tratados com MSG, como indicam os dados relativos ao comprimento corporal ao final do experimento. O exercício físico induz diversas alterações bioquímicas importantes para o crescimento somático. Tais alterações podem estar relacionados aos níveis do hormônio do crescimento (GH). O GH tem muitos efeitos biológicos sobre o crescimento corporal, afetando o metabolismo das proteínas, dos carboidratos e dos lipídios e estimulando o crescimento ósseo e cartilaginoso. Já foi demonstrado que a administração de GH exógeno restaura peso e comprimento corporais em ratos jovens submetidos à desnutrição protéica (24). Os níveis circulantes de GH podem ser influenciados pela atividade física, com tendência à elevação em exercícios acima do limiar anaeróbio (25).

Estudos envolvendo a obesidade têm se intensificado nos últimos anos em função da escalada cada vez maior da incidência dessa doença. A obesidade aparece ligada a patologias como doenças cardiovasculares, dislipidemias, diabetes mellitus, entre outros problemas. Isto justifica o investimento cada vez maior em novas pesquisas sobre o tema. Por razões óbvias, grande número de pesquisas envolvendo a obesidade têm sido conduzidas em animais de laboratório, especialmente o rato. Nesse contexto, os resultados aqui apresentados são indicativos de que o modelo experimental usado no presente estudo pode ser útil em pesquisas que visem ampliar os conhecimentos sobre o papel do exercício na

prevenção e no tratamento da doença.

Em resumo, a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A droga utilizada (MSG) no presente estudo com a finalidade de induzir obesidade nos ratos foi eficiente já que os animais tratados apresentaram maiores teores de gordura na carcaça que os controles.
- protocolo de treinamento físico intermitente melhorou o condicionamento físico aeróbio dos animais, uma vez que os ratos treinados mostraram menor acúmulo de lactato durante o exercício em comparação aos sedentários.
- Ambos os programas de treinamento físico empregados foram eficientes no controle ponderal, na medida que os ratos obesos treinados apresentaram menor ganho de peso que os sedentários equivalentes.
- Esse menor ganho de peso apresentado pelos ratos treinados provavelmente, deveu-se ao menor acúmulo de gordura, pois tanto o peso do tecido adiposo epididimal quanto o percentual de gordura na carcaça foram inferiores em relação aos sedentários.
- Os efeitos de ambos os protocolos de treinamento foram transitórios uma vez que após o período de destreinamento essas tendências desapareceram.

REFERÊNCIAS

1. Scalfani A. Animal models of obesity: classification and characterization. *Int J Obesity*, 1984;8: 491-508.
2. Hunter GR, Weinsier RL, Bamman MM, Larson DE. A role for high intensity exercise on energy balance and weight control. *Int J Obesity & Rel Metabol Disorders* 1998;6: 489-93.
3. Snyder KA, Donnelly JE, Jabobsen DL, Hertner G, Jakicic JM. The effects of long-term, moderate intensity, intermittent exercise on aerobic capacity, body composition, blood lipids, insulin and glucose overweight females. *Int J Obesity* 1997;21: 1180-9.
4. Gobatto C, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos, LA Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem & Physiol Part A* 2001;130:21-7.
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-75.
6. Giles KW and Meyers A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxynucleic acid. *Nature* 1961;1: 206-6.
7. Winick M, Basel JA, Rosso PA. Nutrition and cell growth. In: Winick M.editor. *Nutrition and development*. New York: John Wiley & Sons, 1972.p.

8. Kokubun E and Daniel JF. Relações entre a intensidade e duração das atividades em partidas de basquetebol com as capacidades aeróbia e anaeróbia: estudo pelo lactato sanguíneo. *Rev Paulista Ed Fis* 1992;6(2): 37-46.
9. Donovan CM and Brooks GA. Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am J Physiol* 1983; 244: 463-70.
10. Remke H, Wilsdorf A, Müller F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp Pathol* 1988;33: 223-32.
11. Dolnikoff, M, Martín-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera, E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obesity* 2001; 25: 426-33.
12. Nascimento-Curi CMO, Marmo MR, Egami, M, Ribeiro EB, Andrade IS, Dolnikoff MS. Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis and lipoprotein lipase activity in adult rats. *Biochem Int* 1991; 24: 927-935.
13. Tokuyama K and Himms-Hagen H. Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate-treated mice. *Am J Physiol* 1986; 251: E407-15.
14. Djazayeri A, Miller D S, Stock MJ. Energy balances in obese mice. *Nutr Metab* 1979; 23: 357-367.
15. Caputo FA, Ali SF, Wolf GL, Scallet AC. Neonatal MSG reduces hypothalamic DA, β -endorphin, and delays weight gain in genetically obese ($A^{y/y}$) mice. *Pharmacol Biochem & Behav* 1996; 53: 425-32.
16. De Hirsh J and Han PW. Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation and obesity. *J Lip Res* 1969; 10:77.
17. Ochi M, Fukuhara K, Sawada, T, Hattori, T, Kusunoki T. Development of the epididymal adipose tissue in monosodium glutamate-induced obese mice. *J Nut Sci Vitaminol* 1988; 34: 317-26.
18. Ribeiro EB, Nascimento CMO, Andrade IS, Hirata AE, Dolnikoff MS. Hormonal and metabolic adaptations to fasting in monosodium glutamate-obese rats. *J Comp Physiol* 1997; B167: 430-7.
19. Marmo MR, Dolnikoff MS, Kettelhut IC, Matsushita DM, Hell NS, Lima FB. Neonatal monosodium glutamate treatment increases epidymal adipose tissue sensitivity to insulin three-month old rats. *Braz J Med & Biol Res* 1994; 27:1249-53.
20. Couto, GEC. Efeito do exercício físico contínuo sobre o metabolismo lipídico de ratos tornados obesos pelo tratamento com glutamato monossódico (MSG) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo: 1995.
21. Powers SK, Howley ET, Cox R. A differential catecholamine response during prolonged exercise and passive heating. *Med Sci Sports Exerc* 1982;14 (06): 453-9.
22. Jéquier E and Tappy L. Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 1999; 79: 451-80.
23. Sjodin AM, Forslund AH, Westerterp KR, Andersson AB, Forslund JM, Hambraeus LM. The influence of physical activity on BMR. *Med Sci Sports Exerc* 1996;28(1):85-91.
24. Muaku SM, Thissen JP, Gerard G, Katelegers JM, Maiter D. Post natal catch-up growth induced by growth hormone and insulin growth factor-1 in rats with intrauterine growth retardation caused by maternal protein malnutrition. *Ped Res* 1997; 42: 370-7.
25. Felsing NE, Brasel JA, Cooper DM. Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:157-62.

Recibido: 02-06-2003

Aceptado: 13-02-2004

Evaluación del impacto nutricional del programa de alimentación complementaria de Panamá en niños menores de 5 años

Eira de Caballero, Odalis Sinisterra, Francisco Lagrutta y Eduardo Atalah S.

Ministerio de Salud, Panamá - Facultad de Medicina, Universidad de Chile

RESUMEN. El objetivo fue evaluar el impacto nutricional del Programa de Alimentación Complementaria (PAC) del Ministerio de Salud de Panamá en niños menores de 5 años. Se estudió una cohorte retrospectiva de beneficiarios, comparando la evolución nutricional de ellos desde 6 meses antes hasta 9 meses después de la intervención, con relación a lo observado en niños de la misma edad no intervenidos. Cada beneficiario recibió 6 libras mensuales de un suplemento alimentario de cereales y leguminosas, fortificado con calcio, hierro y vitamina A, que aporta 350 Kcal y 12 gramos de proteínas por 100 gramos. Se analizó el cambio promedio en los indicadores antropométricos y la tasa de recuperación de niños desnutridos y en riesgo, en función de variables socioeconómicas, nutricionales y el tiempo de permanencia en el programa. Al ingreso la relación peso-edad y peso-talla promedio fue $-1,5 \pm 1,2$ DE y $-0,6 \pm 0,9$ DE respectivamente. Antes de la intervención hubo una disminución significativa de la relación peso-edad y talla-edad ($-0,6 \pm 1,2$ y $-0,3 \pm 1,3$ respectivamente, $p < 0,01$), tendencia que posteriormente se estabilizó. Después de 9 meses de intervención, el cambio promedio de peso-edad fue $0,0 \pm 1,1$ y de talla-edad $-0,1 \pm 1,1$ (NS). El cambio promedio de peso-edad fue mayor en niños con mayor déficit inicial ($p < 0,001$), en familias con mejor escolaridad y menor número de hijos ($p < 0,05$). Un 35% de los niños desnutridos intervenidos y un 24% de los niños en riesgo mejoró parcialmente o normalizó su estado nutricional. El impacto nutricional del programa fue pobre, siendo mejor en familias con mejores condiciones socioeconómicas y en niños con mayor déficit nutricional al ingreso.

Palabras clave: Intervención nutricional, niños, desnutrición, peso-edad, talla-edad, ganancia de peso, suplementación alimentaria.

SUMMARY. Assessment of the nutritional impact of the complementary feeding program of Panama in children under five years old. To evaluate the nutritional impact of the Complementary Feeding Program of Panama in children under 5 years old. A retrospective cohort of children beneficiaries of the program was studied and compared with others of the same age and districts not involved in this intervention. Weight for age (W-A), height for age (H-A), and weight for height (W-H) was calculated in each control and the nutritional status determined according to Ministry of Health norms. Every beneficiary received six pounds/month of a food supplement containing cereals, legumes, calcium, iron and vitamin A (350 Kcal and 12 g of protein by 100 grams). Most of the children enter into the program in their second year of life with an average W-A and W-H of -1.5 ± 1.2 and -0.6 ± 0.9 respectively; both indicators were declining before the intervention (-0.6 ± 1.2 y -0.3 ± 1.3 respectively, $p < 0.01$). In 9 months of intervention an average change in W-A of 0.0 ± 1.1 and H-A of -0.1 ± 1.1 was observed (NS). Weight gain was higher in children with lower W-A, in families with less children or mother with better education level ($p < 0.05$). In 35% of malnourished children and 24% of children at risk nutritional status improved during the intervention. Children with higher nutritional deficit at the beginning of the program have significantly better nutritional improvement ($p < 0.001$), encouraging the importance on focusing this program in malnourished children.

Key words: Complementary feeding program, malnutrition, children, weight for age, weight gain, intervention

INTRODUCCION

De acuerdo con la Encuesta de Nivel de Vida de la República de Panamá de 1997 el 6,8% de los niños menores de 5 años presentaba desnutrición global (relación peso-edad < -2 DE), el 14,4% retardo de talla (talla-edad < -2 DE) y el 1,1% desnutrición aguda (peso-talla < -2 DE). Estas cifras variaban significativamente al desagregar la muestra, siendo los indígenas de áreas rurales los más afectados, con prevalencias de déficit de peso-edad y talla-edad de 21,0% y

48,7% respectivamente (1-3).

La suplementación de alimentos es una de las estrategias más utilizada para prevenir y/o tratar la desnutrición infantil, aunque los resultados no siempre han sido efectivos (4-7). El Ministerio de Salud de Panamá desarrolla desde hace varios años una intervención orientada a reducir la prevalencia de desnutrición materno infantil de los grupos más vulnerables, focalizada según nivel de pobreza, edad, estado fisiológico y situación nutricional (8). En los 28 distritos más pobres del país (distritos prioritarios) los beneficiarios son niños de 6 a

59 meses con riesgo nutricional (peso-edad entre $-1,0$ y $-1,9$ DE o con incremento inadecuado de peso en 2 controles sucesivos) y con desnutrición (peso-edad < -2 D.E). En los 39 distritos no prioritarios reciben el alimento los niños de 6 a 59 meses que presentan desnutrición. A cada beneficiario se le entregan gratuitamente 6 libras de un suplemento alimentario elaborado con harina de maíz y soya, fortificada con vitaminas y minerales (Nutricrema), lo que permite la preparación de dos raciones diarias de 45 gramos cada una. El producto es instantáneo y aporta 350 Kcal, 12 gramos de proteínas, 220 ug de vitamina A, 5,7 mg de hierro y 250 mg de calcio por cada 100 gramos. Los niños desnutridos permanecen en el programa por 6 a 9 meses o hasta lograr la recuperación según peso/talla.

Una evaluación realizada en 1998 demostró diversas debilidades del programa: inconsistencias severas en la información, limitado monitoreo y supervisión en los diferentes niveles de ejecución, falta de coordinación entre las unidades ministeriales participantes, subregistro, baja confiabilidad de la información nutricional, problemas en el almacenamiento de los alimentos, entrega irregular del producto e inadecuada selección de los beneficiarios (9). En una muestra de 692 beneficiarios, más del 60% había recibido el alimento sólo una o dos veces. El 11% de los niños ingresados con desnutrición leve evolucionó favorablemente y el 29% de los desnutridos moderados presentó alguna mejoría. La baja proporción de niños que permanecieron en el programa los 6 meses que establecía la norma impidió analizar la evolución en función de esta variable.

En los últimos años ha mejorado en forma importante la gestión del programa. La entrega de alimentos ha sido bastante regular y han habido mayores esfuerzos en supervisión, capacitación y mejorar la calidad de los registros. En una publicación previa analizamos la aceptabilidad y consumo del suplemento en mujeres embarazadas y niños menores de 5 años, demostrando que los niños consumían en promedio $3,2 \pm 1,2$ raciones diarias de $35,0 \pm 22,2$ gramos, superando las recomendaciones del Ministerio de Salud (10). El propósito de este estudio fue evaluar el impacto nutricional del Programa de Alimentación Complementaria (PAC) en niños menores de 5 años, información fundamental para introducir los cambios necesarios para mejorar su eficiencia y eficacia.

MATERIAL Y METODO

Se estudió una cohorte retrospectiva de niños ingresados al programa los 9 meses previos a la recolección de la información. Considerando que no se disponía de un grupo control comparable desde el punto de vista nutricional se analizó la evolución del peso y la talla en la misma cohorte los 6 meses anteriores a su incorporación al programa. En

forma complementaria se analizó la evolución nutricional de niños de edades similares controlados en los mismos Centros de Salud, que no recibieron la Nutricrema.

El tamaño de muestra fue estimado para obtener información con 95% de confianza y 80% poder tanto en los Distritos prioritarios ($n = 28$) como no prioritarios ($n = 39$). Se consideró que el programa permitiría un 33% de reducción en la prevalencia de déficit de peso para la edad y una relación 1:1 entre intervenidos y controles, lo que determinó la necesidad de estudiar 221 beneficiarios en los distritos prioritarios, 235 en los no prioritarios e igual número de controles.

La selección de la muestra fue aleatoria, por etapas y proporcional al tamaño de la población atendida en el PAC. Se excluyeron de la muestra los Distritos que en 1999 atendieron menos de 300 beneficiarios, seleccionándose 8 Distritos prioritarios y 7 no prioritarios. En 3 de los 15 Distritos había más de un Centro de Salud seleccionándose al azar 6 de los 33 Centros existentes, de modo que la muestra fue finalmente obtenida en 18 Centros de Salud. Al interior de cada Centro de Salud se seleccionaron aleatoriamente los beneficiarios, dando la misma posibilidad de ingresar a la muestra a todos los menores de cinco años inscritos los 6 a 9 meses previos.

La información fue obtenida por 19 Enfermeras capacitadas a través de un taller de 12 horas de duración. Los datos fueron obtenidos del tarjetario del PAC, incluyendo tanto los casos activos como inasistentes a control. En el grupo control se utilizaron los expedientes clínicos y las tarjetas de seguimiento. Se recopiló información sobre peso, talla y edad seis meses antes de ingresar al programa, al ingreso y cada tres meses hasta completar 9 meses. Se obtuvo además información sobre las características socio demográficas de la familia, número de controles en el período y tiempo de permanencia en el programa.

Se generó una base de datos en Excel, la que fue validada antes de su procesamiento. Los valores fuera de rango fueron verificados, corregidos o eliminados cuando existían dudas sobre su validez. Con el programa Anthro se calculó el puntaje z para la relación peso-edad, talla-edad y peso-talla y se clasificó el estado nutricional de acuerdo a las normas ministeriales: normal: peso-edad > -1 DE ; riesgo entre -1 y $-1,9$ DE; desnutrición: ≤ -2 DE.

Los datos fueron procesados con el programa STATA versión 6.0 (11). Se utilizaron distribuciones de frecuencia para las variables categóricas y promedio y DE para las variables continuas. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de χ^2 o análisis de varianza según correspondiera. Con el objeto de identificar los factores que se asociaron a la evolución del peso-edad se utilizó un análisis de varianza considerando como variable dependiente el cambio promedio del puntaje z entre el ingreso y los 9 meses

de intervención. Como variables de exposición se consideraron características familiares, nutricionales o vinculadas a la atención de salud. Las variables continuas (edad, número de hijos, número de controles, retiro de alimentos), fueron categorizadas, dependiendo de la distribución de cada variable. En todos los casos se consideraron como significativas diferencias con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En total se estudiaron 857 niños, 429 intervenidos en el PAC y 428 controles (94% de la meta propuesta), con una distribución similar entre distritos prioritarios y no prioritarios.

Las mujeres entrevistadas correspondían en general a madres jóvenes, pertenecientes a familias numerosas, con altos índices de hacinamiento (Tabla 1). El peso promedio de nacimiento fue 3.059 ± 445 gramos, 10% de los cuales era inferior a 2500 gramos. Los beneficiarios del PAC correspondían a familias más numerosas, con mayor número de hijos, mayor grado de hacinamiento y menor peso al nacer ($p < 0,001$), lo que refleja una mayor vulnerabilidad social. También se observó menor nivel de instrucción de los padres y peores condiciones de saneamiento básico en el grupo intervenido ($p < 0,001$, datos no mostrados).

TABLA 1
Características socio demográficas de las familias estudiadas

Variable	Grupo Intervenido n = 429 X ± DE	Grupo Control n = 428 X ± DE	p
Edad de la madre años	26,0 ± 6,5	24,7 ± 6,0	< 0,01
Personas en el hogar	7,9 ± 4,9	6,5 ± 3,6	< 0,001
Habitaciones para dormir	2,0 ± 1,1	2,2 ± 1,0	< 0,05
Personas por habitación	5,1 ± 4,0	3,9 ± 3,8	< 0,001
Hijos número	3,6 ± 2,6	2,7 ± 2,0	< 0,001
Peso de nacimiento gramos	2.948 ± 427	3.163 ± 427	< 0,001

La mayor parte de los niños ingresaron al PAC el segundo año de vida, con un déficit promedio de aproximadamente 1,5 DE respecto al peso y talla de referencia para la edad (Tabla 2). La relación peso-talla estaba menos comprometida y solo en el 20% de los casos se situó bajo - 1 DE. Destaca una situación bastante más favorable en los "controles" en todos los indicadores, lo cual sugiere que no pueden ser considerado como tales. De acuerdo a la relación peso-edad al ingresar al programa el diagnóstico fue 24% desnutrición, 59% riesgo y 17% normal en el grupo intervenido y 2% desnutrición, 11% riesgo y 87% normal en el grupo control ($\chi^2 277,6 p < 0,001$).

TABLA 2
Edad y características antropométricas promedio de los niños intervenidos y controles al inicio del período de observación

Variable	Grupo Intervenido X ± DE	Grupo Control X ± DE	p
Edad meses	21,5 ± 12,7	25,2 ± 10,3	< 0,001
Peso Kg	9,5 ± 2,4	12,2 ± 2,3	< 0,001
Talla cm	77,3 ± 11,0	83,9 ± 8,7	< 0,001
Peso-edad puntaje Z	-1,5 ± 1,2	-0,1 ± 1,2	< 0,001
Talla-edad puntaje Z	-1,6 ± 1,6	-0,5 ± 1,4	< 0,001
Peso-talla puntaje Z	-0,6 ± 0,9	0,4 ± 1,1	< 0,001

Durante el primer trimestre de participación en el programa se logró un incremento de peso similar en ambos grupos, pero en los controles sucesivos se producen ventajas significativas a favor del grupo no intervenido (Tabla 3). El aumento de peso en ambos grupos fue aceptable en función del valor esperado para la edad, pero insuficiente para compensar el déficit previo en el grupo intervenido. El crecimiento en talla fue similar en ambos grupos y los valores de acuerdo con lo esperado para la edad.

TABLA 3
Incremento promedio de peso y talla durante el período de observación

Tiempo	X ± DE gramos	X ± DE gramos	N.S.
Peso			
Primeros 3 meses	670 ± 676	766 ± 921	
Primeros 6 meses	1.058 ± 789	1.242 ± 915	< 0,02
Durante los 9 meses	1.546 ± 899	1.860 ± 1028	< 0,001
Talla			
Primeros 3 meses	2,7 ± 2,7	2,9 ± 2,4	N.S.
Primeros 6 meses	4,7 ± 3,4	5,0 ± 2,9	N.S.
Durante los 9 meses	6,4 ± 3,5	7,0 ± 2,9	N.S.

La evolución del puntaje z para los tres indicadores se presenta en la Tabla 4. En el grupo intervenido se observa un deterioro significativo del peso antes de ingresar al programa (- 0,4 DE), tendencia que se estabilizó durante la intervención, sin que se lograra mejoría de este indicador. El grupo no intervenido se mantuvo muy cerca de la normalidad durante todo el período estudiado. Las tendencias fueron similares para talla-edad, con un deterioro antes de ingresar al programa y una estabilización posterior en los beneficiarios del PAC. El grupo no intervenido en cambio presentó un déficit leve de talla, que se mantuvo durante el seguimiento. La relación peso-talla siguió la misma tendencia, aunque con valores promedios en un rango normal en ambos grupos.

TABLA 4

Evolución de los indicadores antropométricos expresados como puntaje Z promedio en los niños beneficiarios del PAC y grupo control

Peso-edad	Grupo Intervenido X ± DE	Grupo Control X ± DE	p
6 meses antes del ingreso	-1,0 ± 1,2 ¹	0,1 ± 1,4 ²	< 0,001
Ingreso	-1,5 ± 1,2 ³	-0,1 ± 1,2 ³	< 0,001
3 meses	-1,5 ± 1,4	-0,1 ± 1,1	< 0,001
6 meses	-1,5 ± 1,4	-0,1 ± 1,0	< 0,001
9 meses	-1,6 ± 0,9	0,0 ± 1,2	< 0,001
Talla-edad	X ± DE	X ± DE	
6 meses antes del ingreso	-1,3 ± 1,8 ¹	-0,7 ± 1,5 ²	< 0,001
Ingreso	-1,6 ± 1,6 ³	-0,5 ± 1,4 ³	< 0,001
3 meses	-1,5 ± 2,0	-0,6 ± 1,2	< 0,001
6 meses	-1,6 ± 2,0	-0,5 ± 1,2	< 0,001
9 meses	-1,8 ± 1,2	-0,6 ± 1,2	< 0,001
Peso-talla	X ± DE	X ± DE	P
6 meses antes del ingreso	-0,1 ± 1,1 ¹	0,6 ± 1,2 ²	< 0,001
Ingreso	-0,6 ± 0,9 ³	0,4 ± 1,1 ³	< 0,001
3 meses	-0,5 ± 0,8	0,4 ± 1,0	< 0,001
6 meses	-0,7 ± 0,8	0,4 ± 1,0	< 0,001
9 meses	-0,7 ± 0,8	0,4 ± 1,0	< 0,001

¹ Cambio del puntaje z entre los 6 meses previos y el ingreso p < 0,01.

² Cambio del puntaje z entre los 6 meses previos y el ingreso NS

³ Cambio del puntaje z entre el ingreso y los 9 meses de observación NS

Al comparar el diagnóstico según peso-edad al ingreso y egreso se observó una mejoría en cerca del 30% de los niños que ingresaron desnutridos o en riesgo nutricional (Tabla 5).

Este hecho positivo se contrarresta en parte con algunos niños que deterioraron su estado nutricional, lo que determinó una discreta mejoría en la prevalencia de normalidad al final de la intervención.

TABLA 5

Evolución de la relación peso-edad en los niños beneficiarios del PAC después de 9 meses de intervención

Peso-edad ingreso	n	Peso-edad		Egreso	
		Desnutrido %	Riesgo %	Normal %	Total %
Desnutrido	48	64,6	31,2	4,2	100,0
Riesgo	134	19,4	56,7	23,9	100,0
Normal	25	4,0	28,0	68,0	100,0

Un resumen de los factores que se asocian a la evolución del peso-edad se presenta en la Tabla 6. El nivel de instrucción de la madre y el tamaño de la familia se asociaron significativamente al cambio nutricional, con una mayor recuperación cuando las condiciones sociales eran más favorables. El acceso a los servicios básicos y el nivel de hacinamiento no se asoció a la evolución. La evolución del peso-edad estuvo inversamente asociada a las condiciones nutricionales de ingreso (peso-edad y peso-talla), siendo las variables más determinantes de la velocidad de incremento de peso (p < 0,001). Se observó en cambio una relación inversa entre el tiempo de permanencia en el programa y los cambios de peso-edad (p < 0,01).

TABLA 6

Asociación entre las variables estudiadas y el cambio promedio del peso-edad (puntaje z) durante los 9 meses de permanencia en el PAC

Variable	p	Comentario
Sexo del niño	NS	
Estado civil de la madre	NS	
Instrucción de la madre	< 0,02	Mayor incremento a mayor instrucción de la madre (0,7 DE de diferencia en las categorías extremas)
Instrucción del padre	NS	
Número de personas en el hogar	< 0,05	-0,3 DE en familias de más de 5 personas
Número de hijos	< 0,05	- 0,4 DE en familias con 5 hijos y más
Agua corriente en la casa	NS	
Servicio sanitario instalado	NS	
Índice de hacinamiento	NS	
Edad al ingreso	< 0,001	Mejor evolución en niños ingresados al programa después del año de edad
Peso-edad al ingreso	< 0,001	Mejor evolución en niños con mayor déficit inicial
Peso-talla al ingreso	< 0,001	Mejor evolución en niños con mayor déficit inicial
Numero de controles	NS	
Tiempo de permanencia en el programa	< 0,01	Peor evolución en niños que permanecieron en el programa 7 meses y más

DISCUSION

Los beneficiarios del PAC correspondían a familias más numerosas, con mayor número de hijos, que vivían más hacinadas y con niños de menor peso al nacer. Ello refleja una adecuada focalización del programa que se concentra en familias con mayor vulnerabilidad social. El grupo intervenido tenía importantes diferencias antropométricas con el grupo no intervenido, las que deben tenerse presente al interpretar los resultados, ya que el grupo "control" no lo fue estrictamente. Es muy difícil en este caso definir el diseño adecuado, ya que no existe un verdadero grupo control. El haber considerado la evolución previa al ingreso permite comparar la velocidad de crecimiento antes y después de la intervención, pero tiene el inconveniente de analizar períodos de diferente vulnerabilidad y velocidad de crecimiento.

De acuerdo con los criterios del Ministerio de Salud el 83% de los ingresos eran desnutridos o en riesgo, lo que refleja que en general se cumple con el criterio de selección que establece la norma. Ello refleja una importante mejoría en la gestión respecto a la evaluación anterior (9), lo que también se tradujo en mejores registros y mayor regularidad en la entrega del alimento. Los errores de inclusión (17% de niños que ingresaron con peso-edad normal) podrían corresponder a niños que mantenían o perdían peso en dos controles sucesivos, criterio que también está considerado en la norma, aunque ello no fue verificado en el presente estudio.

El impacto del programa fue pobre y menor del esperado, lo que también ha sido observado en otros estudios, en diversas condiciones sociales (4-6,12). Diversos factores pueden contribuir a explicar el bajo impacto. El primero tiene que ver con la aceptabilidad y consumo real del producto, que puede ser bastante inferior al programado, como ha sido demostrado en diferentes grupos (4,13,14). En este caso el consumo del suplemento fue bueno, incluso superior a lo planificado, como fuera descrito en una comunicación previa (10), representando más del 25% de la necesidad energética de un niño de 2 años. Sin embargo el diseño no permite dilucidar si este aporte fue adicional o simplemente sustituyó parte de la alimentación habitual, como ha sido sugerido en otros estudios (4,16,17). La ayuda alimentaria significaría en estos casos un menor gasto en alimentación para la familia o una transferencia de ingresos, que no necesariamente se invierte en mejorar la alimentación. El bajo impacto podría estar relacionado también con una alta carga de enfermedades infecciosas, especialmente digestivas, por las condiciones sanitarias tan adversas. Finalmente el impacto puede estar asociado también a la calidad de la atención recibida, especialmente con relación a la educación nutricional u otras actividades que contempla la intervención (18).

La evolución más favorable en familias con condiciones sociales menos críticas sugiere que se requiere un umbral

mínimo para lograr impacto. Es posible que la ayuda alimentaria sea insuficiente en un ambiente muy deprivado, con deficientes condiciones sanitarias y con mayor probabilidad de dilución intrafamiliar del producto. Una evaluación similar realizada en familias pobres de Santiago, pero con mejores condiciones socioeconómicas, demostró un mayor impacto nutricional, a pesar de que el aporte nutricional del suplemento alimentario era menor (12).

El principal efecto demostrable del programa fue evitar un mayor deterioro nutricional, especialmente en los niños desnutridos, como venía observándose los meses previos al ingreso. De acuerdo a la tendencia anterior era esperable una disminución de alrededor de 0,5 DE en los indicadores antropométricos, lo que no se produjo. Aún cuando es un resultado relativamente modesto al menos se evitó un mayor daño nutricional en un período de alta vulnerabilidad. En el presente estudio no se analizó un posible impacto en relación a la situación nutricional de hierro y vitamina A, lo que eventualmente podría mejorar la relación costo-beneficio de la intervención.

Como ha sido demostrado en otros estudios el cambio en la relación peso-edad estuvo inversamente asociado a las condiciones nutricionales de ingreso (peso-edad y peso/talla), siendo la variable más determinante de la evolución. Ello reafirma la importancia de priorizar la selección de niños desnutridos como receptores de la ayuda alimentaria. Es atractivo desde un punto de vista preventivo intervenir los niños con riesgo nutricional o con una curva de peso aplanada, pero de acuerdo a los resultados de esta y otras evaluaciones sería una intervención poco costo-efectiva.

Se observó también una relación inversa entre el número de meses que el beneficiario permaneció en el programa y el cambio en el estado nutricional. Esta situación que podría parecer paradójica se podría explicar porque los niños que permanecen más tiempo en el programa (hasta 26 meses en el estudio actual) son los beneficiarios que tienen una evolución más negativa. Lo ideal sería analizar el retiro de alimentos sólo en los 9 meses de observación, pero la forma en que fue obtenido el dato no permite hacer la diferenciación. En todo caso sugiere la necesidad de limitar el tiempo máximo de permanencia en el programa.

En resumen, a pesar de la buena aceptabilidad y consumo del suplemento, su efecto nutricional fue limitado. Ello sugiere la necesidad de redefinir el tipo de beneficiarios, hacer un análisis más profundo sobre la calidad de la atención entregada, especialmente respecto a educación nutricional y buscar mecanismos que aseguren que el producto se sume y no reemplace la alimentación habitual, factores que podrían ser en parte responsable del bajo impacto de la intervención.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración brindada por diversas personas y organismos sin cuyo apoyo la recolección de la información y el desarrollo de este estudio hubiese sido imposible. En forma especial deseamos expresar nuestros agradecimientos a:

- Madres y niños beneficiarios del programa de alimentación complementaria del Ministerio de Salud que aceptaron ser entrevistados.
- UNICEF, Panamá: Licdo. Miguel Cuellar. Oficial de Proyectos
- Fundación Pro Niños del Darién - Licda. Rosario Aguilar, Licda. Aura Vásquez
- Personal de las diversas Regiones del Ministerio de Salud que realizaron las encuestas:
- Auxiliares de Nutrición: Josefina Vargas, Guadalupe Muñoz, Mariela Portillo, Melissa Batista, Nadia Orribarra, Bautista Arcia, Melva Jované, Maribel Serrano, Zuleika Alvarado, Sophia de Kennedy, Agustina Lasso, Mayra Domínguez, Marianela Villarreal, Aymara Rodríguez, Isis Barrios, Mayra Arango, Deyanira Piñero, Maritza Tamayo, Maira Catillo, Vilma Castillo, Doris Díaz, Rosaura Gonzalez, Clara Palacio, Adela Fernández
- Enfermeras : Josefina Vargas, Sabi Chiari
- Nutricionistas: Dolca Pittí, Gigi Santamaría
- Personal del Departamento de Nutrición, Ministerio de Salud; Licda. Yeny Carrasco, Sra. Ileana Flores: limpieza y codificación de datos.

REFERENCIAS

1. República de Panamá. Estudio sobre la Pobreza. Ministerio de Economía y Finanzas. Ciudad de Panamá, 1997.
2. República de Panamá. Ministerio de Salud. Estudio de línea base del componente de nutrición del Proyecto de Salud Rural. Ciudad de Panamá, 1997.
3. República de Panamá. Ministerio de Salud. Situación Alimentaria Nutricional. Serie de Cuadernos técnicos de salud. Ciudad de Panamá, 2001.
4. Allen L, and Gillespie S. What Works?. A review of the efficacy and effectiveness of nutrition interventions. United Nations Administrative Committee on Coordination Sub-Committee on Nutrition. September 2001.
5. Brown KH. WHO/UNICEF review on complementary feeding and suggestions for future research: WHO/UNICEF guidelines on complementary feeding. *Pediatrics* 2000;106: 1290.
6. Simondon KB, Gartner A, Berger J, Cornu A, Massamba JP, San Miguel JL, Ly C, Missotte I, Simondon F, Traissac P, Delpeuch F, Maire B. Effect of early, short-term supplementation on weight and linear growth of 4-7-mo-old infants in developing countries: a four-country randomized trial. *Am J Clin Nutr* 1996 Oct;64(4):537-45
7. Carruth BR, Skinner JD, Houck KS, Moran JD 3rd. Addition of supplementary foods and infant growth (2 to 24 months). *J Am Coll Nutr* 2000 Jun;19(3):405-12.
8. República de Panamá. Ministerio de Salud. Normas de distribución de alimentos. Ciudad de Panamá, 2001.
9. Amaris A, Caballero, E, Sinisterra O. Supervisión evaluativa: una aproximación a la investigación gerencial. Experiencia inicial en el Programa de Atención Nutricional. Ministerio de Salud, Panamá 1998.
10. De Caballero, E, Atalah E. Evaluación de la aceptabilidad y consumo de un suplemento alimentario en la República de Panamá. *Rev. Chil Nutr* 2003; 30: 133-40.
11. Stata Corp. STATA statistical software: release 6.0. College Station, Texas, USA, 1999.
12. Fernández M, Atalah E. Impacto del programa de tratamiento de lactantes en riesgo nutricional en la Región Metropolitana. *Rev Chil Pediatr* 2001; 72: 328-333.
13. Atalah E, Benavides X, Cárdenas R, Barahona S, Espinoza M. Aceptabilidad y consumo de un suplemento alimentario en el adulto mayor. *Rev Chil Nutr* 2001; 28: 438-45.
14. Atalah E, Barja I, Rosales I. Aceptabilidad y Consumo del Suplemento en el Embarazo. Consejo Nacional de Alimentación y Nutrición, Departamento de Nutrición. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, 1980.
15. Lartey A, Manu A, Brown KH, Peerson JM, Dewey KG. A randomized, community-based trial of the effects of improved, centrally processed complementary foods on growth and micronutrient status of Ghanaian infants from 6 to 12 mo of age. *Am J Clin Nutr* 1999;70: 391-404.
16. Bhandari N, Bahl R, Nayyar B, Khokhar P, Rohde JE, Bhan MK. Food supplementation with encouragement to feed it to infants from 4 to 12 months of age has a small impact on weight gain. *J Nutr* 2001;131:1946-51.
17. Fauveau C, Siddiqui M, Briend A, Silimperi DR, Begum N, Fauveau V. Limited impact of a targeted food supplementation programme in Bangladeshi urban slum children. *Ann Trop Paediatr* 1992;12(1):41-6.
18. Fernández M, Atalah E. Calidad de la atención de los menores de dos años controlados en el programa de riesgo de desnutrir en el Gran Santiago. *Rev Chil Pediatr* 2000: 71: 485-90.

Recibido: 12-02-2003

Aceptado: 01-03-2004

Diseño de un plan de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) para el aseguramiento de la inocuidad de la mortadela elaborada por una empresa de productos cárnicos

Lizet Bou Rached, Norelis Ascanio y Pilar Hernández

Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas. Inacor S.A., Carrizal,
Edo. Miranda, Venezuela

RESUMEN. El Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, conocido universalmente por sus siglas en inglés como HACCP, es un programa integral sistemático de identificación y estimación del peligro (microbiológico, químico y/o físico) y sus riesgos generados durante la producción primaria, el procesamiento o elaboración, almacenamiento, distribución, expendio y consumo de alimentos. Establecer un programa de HACCP permite enfatizar más en la prevención que en la detección, disminuye los costos, minimiza el riesgo de fabricar productos defectuosos, ofrece mayor confianza a la gerencia, fortalece la competitividad nacional e internacional, entre otras ventajas. Este trabajo es una propuesta basada en el diseño de un programa de HACCP orientado a garantizar la inocuidad de la Mortadela tipo Especial elaborada por una industria de productos cárnicos, a través de la determinación de peligros (microbiológicos, químicos o físicos), la identificación de puntos críticos de control (PCC), el establecimiento de límites críticos, el plan de acciones correctivas y el establecimiento de procedimientos de documentación y verificación. La metodología utilizada se fundamentó en la aplicación de los Siete Principios Básicos establecidos por el Codex Alimentarius, obteniendo como resultado el diseño de dicho programa. En vista de que recientemente se vinculan los productos cárnicos con patógenos como *E. coli O157:H7* y *Listeria monocytogenes*, éstos se contemplaron como peligros microbiológicos para el establecimiento del plan HACCP, cuya aplicación garantizará la obtención de productos inocuos.

Palabras clave: HACCP, inocuidad, productos cárnicos, mortadela.

SUMMARY. Design of a Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) Plan to assure the safety of a bologna product produced by a meat processing plant. The Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) is a systematic integral program used to identify and estimate the hazards (microbiological, chemical and physical) and the risks generated during the primary production, processing, storage, distribution, expense and consumption of foods. To establish a program of HACCP has advantages, being some of them: to emphasize more in the prevention than in the detection, to diminish the costs, to minimize the risk of manufacturing faulty products, to allow bigger trust to the management, to strengthen the national and international competitiveness, among others. The present work is a proposal based on the design of an HACCP program to guarantee the safety of the Bologna Special Type elaborated by a meat products industry, through the determination of hazards (microbiological, chemical or physical), the identification of critical control points (CCP), the establishment of critical limits, plan corrective actions and the establishment of documentation and verification procedures. The used methodology was based in the application of the seven basic principles settled down by the Codex Alimentarius, obtaining the design of this program. In view of the fact that recently the meat products are linked with pathogens like *E. coli O157:H7* and *Listeria monocytogenes*, these were contemplated as microbiological hazard for the establishment of the HACCP plan whose application will guarantee the obtaining of a safe product.

Key words: HACCP, safety, meat products, bologna.

INTRODUCCION

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cientos de miles de personas en el mundo padecen enfermedades causadas por la contaminación de los alimentos, además de los riesgos a la salud; esto pone en peligro el bienestar financiero de los establecimientos fabricantes de alimentos alrededor del mundo, perjudica al comercio y el turismo, ocasiona pérdidas de ingresos, desempleo y demandas. Los sistemas de control de higiene y calidad de los productos alimenticios surgen con los

objetivos de evitar la producción de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y afrontar con mayor competitividad la globalización de los mercados. Este entorno exige por lo tanto un cambio en el control de los productos alimentarios, que implica pasar de los tradicionales controles aleatorios, a un sistema de autocontrol para el aseguramiento de la calidad del producto final. Hoy día esa vigilancia tiene que incluir todas las fases de la cadena agroalimentaria desde el productor hasta el momento que el alimento llega a la mesa para ser consumido (1).

Nace así el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), reconocido mundialmente como un enfoque sistemático y preventivo que considera los peligros biológicos, químicos y físicos mediante la anticipación y la prevención, en lugar de la inspección del producto final (2). Todo sistema de HACCP es capaz de adaptarse a cambios tales como los progresos en el diseño del equipo o en los procedimientos de elaboración o las novedades tecnológicas (3,4).

Este sistema de carácter preventivo está enfocado hacia el control de las etapas del proceso que son críticas para la producción de alimentos inocuos, en lugar de depender exclusivamente de la verificación de cumplimiento de los requisitos normativos establecidos.

Entre las ventajas de este sistema, además de la mayor inocuidad de los alimentos, figuran un mejor aprovechamiento de los recursos, una respuesta más oportuna a los problemas, puede facilitar la inspección por parte de las autoridades fiscalizadoras y promover el comercio internacional al aumentar la confianza en la inocuidad de los alimentos (3,4). Con el sistema HACCP, los fabricantes son los responsables de determinar los aspectos críticos para producir alimentos inocuos (2). Además, la aplicación de este sistema impulsa el desarrollo de tres actividades asociadas con la normalización: las normas sobre productos, los procedimientos de análisis de laboratorio para comprobar el cumplimiento de las normas, lo cual conlleva la necesidad de asegurar la calidad de los laboratorios de pruebas y ensayos y, finalmente, las normas y los procedimientos de auditoría de sistemas, con el propósito de comprobar el correcto diseño y aplicación del sistema HACCP en cada industria (5).

Este programa constituye una herramienta eficaz y oportuna para controlar la inocuidad de los alimentos, a través de la identificación de los peligros y aplicación de medidas para su control.

Previo a la implementación de un sistema HACCP se debe cumplir con los programas de prerrequisitos, entre los cuales figuran las Buenas Prácticas de Fabricación y Almacenamiento, establecidos en la legislación nacional vigente o de acuerdo a la normativa internacional del Codex Alimentarius y otras legislaciones que apliquen; Programas de limpieza y desinfección, control de plagas, capacitación, mantenimiento preventivo, control de proveedores, entre otros (6).

La Empresa de productos cárnicos que elabora esta Mortadela cuenta con los programas de prerrequisitos anteriormente mencionados y los cuales fueron verificados durante el estudio que permitió establecer este diseño. Para la implementación del sistema HACCP, se escogió la Mortadela Tipo Especial puesto que es el producto premium de la empresa, el cual es consumido por un alto porcentaje de la población a nivel nacional, incluyendo niños, ancianos

y enfermos. Además se quiere comercializar el producto a nivel internacional. Con esto se busca expandir el producto en diferentes mercados y a la vez ampliar la aplicación del sistema a otras líneas de producción.

Se consideró incluir en este estudio la evaluación y control del riesgo de transmisión de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en la Mortadela elaborada, debido a que la información epidemiológica en Europa y Estados Unidos, relaciona algunos brotes con el consumo de embutidos. A tal efecto ya existen normas y procedimientos para controlar este riesgo (7,8).

En Venezuela, la aplicación del HACCP hasta la fecha es de acatamiento voluntario, ya que tanto los representantes del sector público como del privado consideraron que no era conveniente exigir el sistema HACCP sin antes tener establecidas y funcionando las Normas de Buenas Prácticas de Fabricación y las normas para las microempresas. No obstante, las exigencias del mercado han llevado a muchas empresas a instaurar este sistema (5).

MATERIALES Y METODOS

El presente diseño se realizó para la línea de producción Mortadela Tipo Especial. Conforme a la Norma Venezolana establecida por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (9), la Mortadela es el producto elaborado a base de carne de cerdo y/o bovino aprobado por la autoridad sanitaria competente, adicionado de tocino, condimentos y especias. Adicionado o no de vísceras comestibles, grasa, sangre, producto proteínico y/o hidrocarbonado, cuero y otros ingredientes aprobados por la autoridad sanitaria competente para su uso en mortadela. Curado, cocido, ahumado o no e introducido en tripas naturales o artificiales. La Mortadela tipo Especial es el producto definido anteriormente, adicionado de producto proteínico y/o hidrocarbonado en cantidad no mayor del 5% del producto terminado. Dentro de este 5% se permite la adición hasta un 3% del producto proteínico. Para la descripción de las Materias Primas utilizadas se tomaron en cuenta los criterios establecidos en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (10) y se incluyeron las especificaciones internas de tipo fisicoquímico y microbiológico. Así mismo se describen y especifican las cantidades de ingredientes, aditivos y material de empaque. Es de señalar, que en la información que brinda el fabricante en la etiqueta de su producto, se indica la temperatura a la cual debe ser conservado el mismo.

El diseño del programa se basó en la aplicación de los siete principios básicos del HACCP establecidos en el Codex Alimentarius (3), y teniendo en cuenta la asignación de categorías de riesgo que establece el FDA, USDA y criterios establecidos por otros autores (11-13), los cuales se llevaron

a cabo mediante el desarrollo de las diferentes etapas que comprenden el mismo:

Principio 1

Realizar un análisis de peligros y asignación de categorías de riesgo: Consiste en la evaluación sistemática de un alimento específico y sus materias primas o ingredientes para determinar los peligros biológicos, químicos y físicos.

Principio 2

Determinar los puntos críticos de control (PCC): Determinar los puntos-procedimientos-etapas operacionales que pueden ser controlados para eliminar riesgos y/o peligros, o minimizar la probabilidad de que se produzcan.

Principio 3

Establecer los límites críticos: Establecer el límite crítico para cada PCC en un alimento específico, el cual deberá vigilarse para asegurar que el PCC esté bajo control.

Principio 4

Establecer un sistema de vigilancia: Establecer un sistema de vigilancia para asegurar el control de los PCC mediante pruebas u observaciones programadas.

Principio 5

Establecer medidas correctivas: Establecer las medidas correctivas adecuadas que deban adoptarse cuando un PCC no esté controlado (o se salga del límite crítico).

Principio 6

Establecer los procedimientos de verificación: Establecer procedimientos para la verificación, incluidas pruebas complementarias, para comprobar que el sistema HACCP funciona correctamente.

Principio 7

Establecer un sistema de documentación: Establecer un sistema de registro en el cual se anoten todos los procedimientos y datos referidos a los principios anteriores y a su aplicación.

Para la correcta aplicación de estos principios se ejecutaron las tareas que se indican en la secuencia lógica detallada en la Figura 1, de acuerdo a lo establecido en las Directrices generales para la aplicación del sistema HACCP (6).

Para la implementación del sistema se aplicaron rigurosamente las etapas descritas por el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA (2).

Se verificó el diagrama de flujo que disponía la Empresa para este producto, incluyéndose el plano de la planta y distribución de los equipos, secuencia de las fases del proceso, incluyendo tiempo/ temperatura de todas las materias primas, productos intermedios y productos finales.

Para la determinación de los puntos críticos de control (PCC) se consideró el árbol de decisión que aparece en la Figura 3 (6,13,14).

FIGURA 1
Secuencia lógica para la aplicación de un sistema HACCP (4,6,13,15,16).

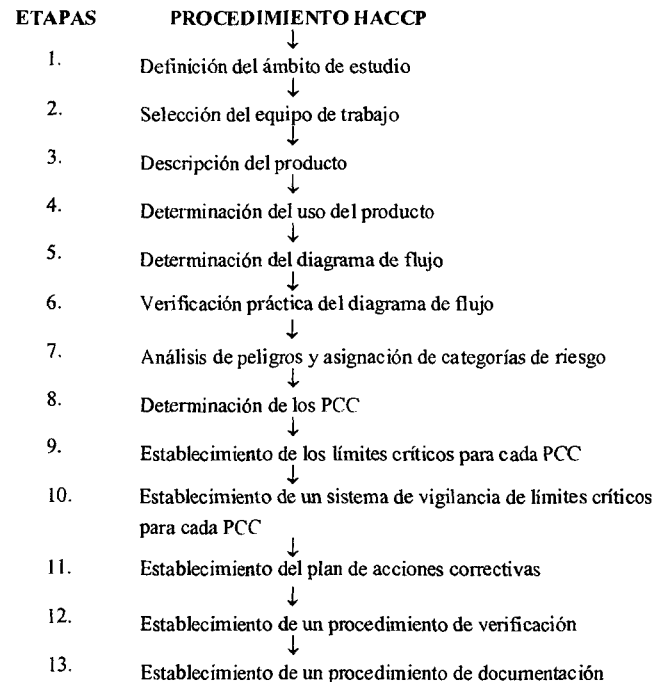
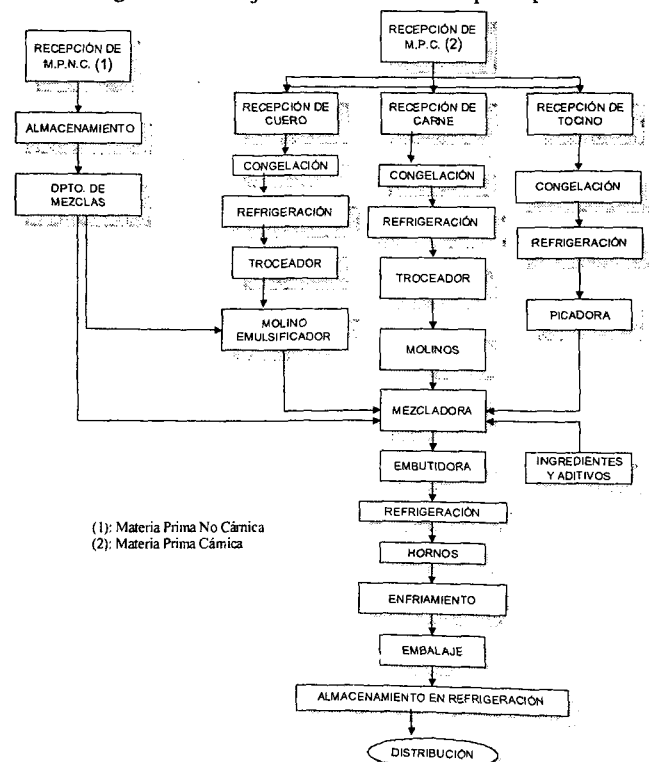


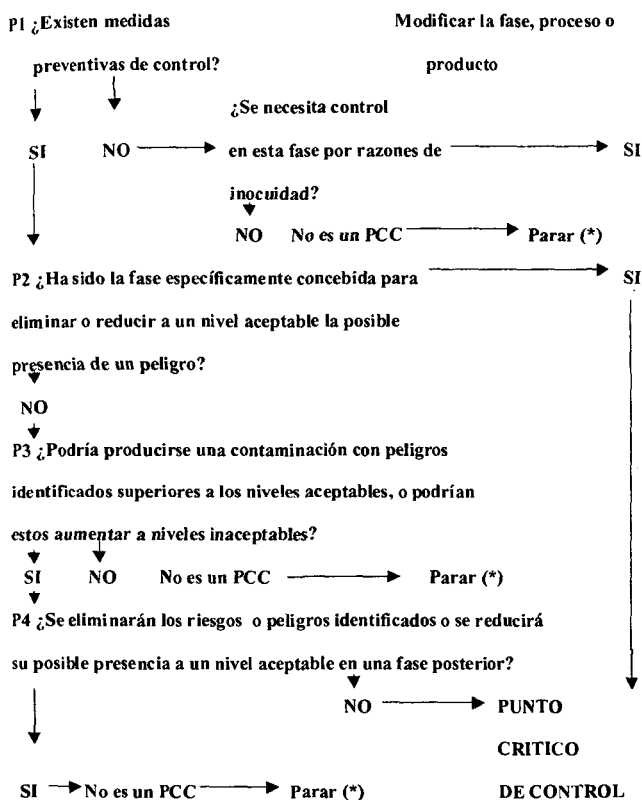
FIGURA 2
Diagrama de flujo de la mortadela tipo especial



(1): Materia Prima No Cárnica
(2): Materia Prima Cárnica

FIGURA 3

Arbol de decisión para la determinación de un punto crítico de control (6,12,14)



(*) Pasar al siguiente peligro identificado del proceso descrito.

RESULTADOS

Una vez realizado el estudio en la línea de Mortadela tipo Especial en la empresa de productos cárnicos se desarrollaron las diferentes etapas que comprenden el Sistema de HACCP, obteniéndose los siguientes resultados:

El equipo de trabajo HACCP se constituyó con las siguientes personas: Especialistas en Calidad, Producción, Higiene y Saneamiento de la planta, Mantenimiento y Recursos Humanos.

El Diagrama de flujo se amplió con la descripción del proceso, desde las materias primas hasta la distribución del producto, lo cual se puede observar en la Figura 2.

El Análisis de peligros y asignación de categorías de riesgo (15), se puede observar en la Tabla 1.

Los resultados de la asignación de categorías de riesgos microbiológicos (15) se encuentran en la Tabla 2.

La asignación de categorías de riesgos químicos y físicos (15) se puede observar en la Tabla 3.

Los puntos críticos de control (PCC) (4) , se pueden observar en la Tabla 4.

El establecimiento de los Límites Críticos para cada Punto Crítico de Control, de un sistema de monitoreo, de un plan de acciones correctivas y de un procedimiento de documentación, se pueden observar en la Tabla 5.

TABLA 1
Análisis de peligros: mortadela tipo especial

Ingredientes	Microbiológico	Tipos de peligros potenciales	
		Químico	Físico
Carne de res	<i>Salmonella, L. monocytogenes, E. coli O157:H7, C. perfringens C. botulinum</i>	Plaguicidas, desinfectantes	Metales
Cuero	<i>Salmonella, L. monocytogenes, S. aureus, B. cereus</i>	Plaguicidas, desinfectantes	Metales
Tocino	<i>Salmonella, L. monocytogenes, E. coli O157:H7, S. aureus, C. perfringens</i>	Plaguicidas, desinfectantes	Metales
Sal	No contiene	Nitrito	Piedras
Especias	<i>Salmonella, S. aureus, Esporulados</i>	Plaguicidas	Piedras, palos, excrementos, insectos y sus huevos y larvas
Azúcar	No contiene	Plaguicidas	Piedras, palos.
Harina de trigo	<i>Salmonella, S. aureus, Esporulados</i>	Plaguicidas	Piedras, palos, insectos y sus huevos y larvas
Aislado proteínico de soya	<i>Salmonella, S. aureus, Esporulados</i>	Plaguicidas	Piedras, palos, insectos y sus huevos y larvas
Aditivos	No contiene	Contaminantes químicos	No contiene
Agua	Patógenos entéricos	Contenido de metales, desinfectantes y productos químicos	No contiene
Hielo	Patógenos entéricos	Contenido de metales, desinfectantes y productos químicos	No contiene

TABLE 2
Peligros microbiológicos: mortadela tipo especial

Materias primas o ingredientes y producto terminado	Asignación de riesgos para peligros microbiológicos						Categorías de riesgo
	A Población especial de alto riesgo	B Ingredientes sensibles	C Existe una etapa en el proceso que destruya los microorganismos	D Recontaminación entre el proceso y el empaque	E Manejo abusivo en la distribución/ consumidor	F Existe un tratamiento térmico aplicado por el consumidor	
Carne de res	0	+	Si	+	+	Si	III
Cuero	0	+	Si	+	+	Si	III
Tocino	0	+	Si	+	+	Si	III
Sal	0	0	Si	0	0	Si	O
Espicias	0	+	Si	+	0	Si	II
Azúcar	0	0	Si	0	0	Si	O
Harina de trigo	0	+	Si	0	0	Si	I
Aislado proteínico de soya	0	+	Si	0	0	Si	I
Aditivos	0	0	0	0	0	0	O
Agua	0	+	0	+	0	0	II
Hielo	0	+	0	+	0	0	II
Producto terminado (refrigeración)	+	+	0	+	+	+	V

0 = Sin riesgo + = Con riesgo

TABLE 3
Peligros químicos y físicos: mortadela tipo especial

Materias primas o ingredientes y producto terminado	Asignación de riesgos para peligros químico y físico						Categorías de riesgo
	A Población especial de alto riesgo	B Ingredientes sensibles	C Existe una etapa en el proceso que remueva los químicos tóxicos y agentes físicos peligrosos	D Recontaminación entre el proceso y el empaque	E Contaminación por parte del distribuidor/ consumidor	F El consumidor puede detectar o remover el químico tóxico o agente físico	
Carne de res	0	+	+	+	0	+	IV
Cuero	0	+	+	+	0	+	IV
Tocino	0	+	+	+	0	+	IV
Sal	0	0	+	0	0	+	II
Espicias	0	+	+	+	0	+	IV
Azúcar	0	0	+	+	0	+	III
Harina de trigo	0	+	+	+	+	+	IV
Aislado proteínico de soya	0	+	+	+	0	+	IV
Aditivos	0	0	+	+	0	+	III
Agua	0	+	+	0	0	+	III
Hielo	0	+	+	0	0	+	III
Producto terminado (refrigeración)	+	+	+	+	+	+	VI

0 = Sin riesgo + = Con riesgo

TABLA 4
Puntos críticos de control: mortadela tipo especial

Etapa	Respuestas al árbol de decisiones				
	P1	P2	P3	P4	¿PCC?
Recepción de materia prima cárnica	Si	No	Si	Si	NO
Suministro de agua	Si	No	No	Na	NO
Recepción de materia prima no cárnica	Si	No	Si	Si	NO
Almacenamiento de materia prima cárnica (congelación)	Si	No	No	Si	NO
Almacenamiento de materia prima no cárnica	Si	No	Si	Si	NO
Refrigeración (carne, cuero, tocino)	Si	No	No	No	NO
Troceador	Si	No	Si	Si	NO
Picadora	Si	No	Si	Si	NO
Molinos	Si	No	Si	Si	NO
Mezcladora	Si	Si	Na	Na	SI
Embutidora	Si	No	Si	Si	NO
Material de empaque	Si	No	Si	Si	NO
Cava de refrigeración producto embutido	Si	No	Si	Si	NO
Hornos	Si	Si	Na	Na	SI
Enfriamiento	Si	No	Si	No	SI
Embalaje y almacenamiento	Si	No	Si	No	SI
Distribución	Si	No	Si	No	SI

Donde: P1: ¿Existen medidas preventivas de control?, P2: ¿Ha sido la fase específicamente concebida para eliminar o reducir a un nivel aceptable la posible presencia de un riesgo o peligro?, P3: ¿Podría producirse una contaminación con riesgos o peligros identificados superiores a los niveles aceptables, o podrían estos aumentar a niveles inaceptables?, P4: ¿Se eliminarán los riesgos o peligros identificados o se reducirá su posible presencia a un nivel aceptable en una fase posterior?

Na: No aplica

TABLA 5

Límites críticos para cada punto crítico de control, sistema de vigilancia, y medidas correctivas: mortadela tipo especial

PCC	Límite crítico	Sistema de vigilancia	Medidas correctivas
Mezcladora	* Límite de aditivos autorizados (NaCl máx. 2%, Nitrito máx. 150 ppm, Nitrato máx. 150 ppm).	* Control de la pesada, identificación y preparación de los aditivos utilizados en producción. * Control del funcionamiento de equipos de pesada. * Adecuada identificación de cada uno de los aditivos.	* De acuerdo al error de pesada, tomar las medidas respectivas para el caso. * Revisar programa de mantenimiento y calibración de los equipos de pesada.
Hornos	* Mínimo 72 °C en el centro de la pieza por 30 min.	* Registro de los tiempos y temperaturas de cocción.	* Ajustar el programa de cocción. * Revisar programa de mantenimiento de los hornos.
Enfriamiento	* Temperatura del agua de enfriamiento ≤ 20 °C. * Niveles de cloro residual $\leq 0,1$ ppm.	* Control de la temperatura del agua de enfriamiento. * Determinación de los niveles de cloro residual.	* Revisión de la temperatura del agua de enfriamiento. * Revisar programa de tratamiento del agua.
Embalaje y almacenamiento	* Temperatura de conservación entre 5°C y 7°C.	* Control de temperatura de la cava de almacenamiento.	* Revisión de la temperatura de la cava de almacenamiento. * Mantenimiento de los equipos.
Distribución	* Temperatura de conservación entre 5°C y 7°C.	* Control de temperatura del transporte. * Revisión de la carga.	* Mantenimiento de los equipos. * Revisión de temperatura.

Cuando el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control para el proceso de manufactura de la Mortadela tipo Especial se haya implementado, deberá someterse a una verificación para corroborar que funciona correctamente, que la aplicación práctica responde a lo previsto en el diseño teórico del sistema y esto debe dar como resultado la ratificación inicial del sistema o su modificación, si se considera que algunos criterios o acciones no fueron los adecuados o pueda mejorarse su eficacia (16). Además debe realizarse una verificación de los PCC

rutinariamente en cada lote, como parte del proceso de producción diario, y una verificación del Programa HACCP cada tres meses o cuando ocurran cambios en el producto-proceso o se tenga nueva información disponible (15).

Estas verificaciones, serán realizadas por personal que integra el equipo HACCP (15,16).

La verificación de los PCC incluye la revisión del control de los parámetros determinados en cada punto crítico. El procedimiento de Verificación para el control de los PCC se encuentra en la Tabla 6.

TABLA 6
Procedimiento de verificación y registro: mortadela tipo especial

PCC	Verificación de los puntos críticos de control	Registros
Mezcladora	Verificar que los límites críticos de aditivos autorizados han sido adecuadamente determinados para el control del riesgo microbiológico (<i>C. botulinum</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli O157:H7</i>); el cumplimiento del control de pesada e identificación y preparación de las mezclas; que se aplicaron las medidas respectivas, si se comete algún error en la pesada; que fue realizada la revisión del programa de mantenimiento y calibración de los equipos de pesada como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; revisar los registros de identificación, pesada y entrega de las mezclas a producción; revisar los registros de mantenimiento y calibración de los equipos de pesada	* Registros de identificación y entrega de los aditivos a producción. * Registros de mantenimiento y calibración de equipos de pesada. * Registros de pesada de todos los ingredientes.
Hornos	Verificar: que los límites críticos para la temperatura en el centro de la pieza y el tiempo de cocción han sido adecuadamente determinados para el control del riesgo microbiológico (<i>C. botulinum</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli O157:H7</i>); los registros de tiempos y temperatura de cocción; que fue aplicado el ajuste del programa de cocción como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones fuera de los límites críticos y que fue efectivo para garantizar la inocuidad del producto; que se realizó la revisión del programa de mantenimiento de los hornos como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; revisar los registros del tratamiento térmico y tiempo de cocción; revisar los registros de mantenimiento de los hornos	* Registros de temperatura y tiempo de cocción. * Registros del mantenimiento de los hornos.
Enfriamiento	Verificar: que los límites críticos para la temperatura del agua de enfriamiento y los niveles de cloro residual han sido adecuadamente determinados para el control del riesgo microbiológico (<i>C. botulinum</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli O157:H7</i>); que fue realizada la revisión de la temperatura del agua de enfriamiento como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; que fue realizada la revisión del programa de tratamiento del agua como acción correctiva, en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; revisar los registros de tiempo y temperatura de enfriamiento; revisar los registros de los resultados obtenidos en los análisis de laboratorio	* Registros de tiempo y temperatura de enfriamiento. * Registros de la concentración de cloro residual.
Embalaje y almacenamiento	Verificar: que el límite crítico de temperatura de conservación ha sido adecuadamente determinado para el control del riesgo microbiológico (<i>C. botulinum</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli O157:H7</i>); que fue realizada adecuadamente la revisión de la temperatura en la cava de almacenamiento como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; la realización adecuada del mantenimiento de los equipos como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; revisar los registros de temperatura de la cava de almacenamiento del producto terminado	* Registros de temperatura y humedad relativa de la cava de almacenamiento de producto terminado.
Distribución	Verificar: que el límite crítico de temperatura de conservación fue determinado adecuadamente para el control del riesgo microbiológico (<i>C. botulinum</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli O157:H7</i>); que se cumple el control de temperatura del transporte; que se cumple la revisión de la carga; que fue aplicado debidamente el mantenimiento de los equipos como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; que fue realizada la revisión de la temperatura de conservación como medida correctiva en caso de detectarse desviaciones en los límites críticos y que ésta fue efectiva para garantizar la inocuidad del producto; revisar el registro de conformidad de salida del transporte	* Registro de conformidad de la salida del transporte. * Registros de temperatura.

Los reportes de verificación pueden incluir información sobre la presencia y adecuación del plan HACCP y las personas responsables del mismo, los registros asociados con la vigilancia de los PCC, registro directo de los datos de la vigilancia de los PCC durante la operación, certificación que el equipo de vigilancia está apropiadamente calibrado y en orden para el trabajo, acciones correctivas para desviaciones, muestreo y métodos de análisis usados para verificar que los puntos críticos están bajo control, modificaciones al plan HACCP, entrenamiento y conocimiento de los individuos responsables para la vigilancia de los puntos críticos de control, actividades de validación (12).

Una vez completada la etapa de verificación, debe prepararse un reporte escrito para certificar que el plan HACCP se está ejecutando tal como fue diseñado. Las desviaciones del plan HACCP deben estar listadas en el reporte y éstas deben ser discutidas con la Gerencia de la planta. Igualmente deben estar documentadas las acciones correctivas tomadas en respuesta a cada una de las desviaciones identificadas (15).

DISCUSION

Mediante el desarrollo de las diferentes etapas que comprende el Sistema HACCP se realizó el diseño del Programa HACCP para la elaboración de la Mortadela tipo Especial, que permitirá el abastecimiento de un producto de calidad e inocuo al consumidor, con base en la prevención y en el control de los factores que afectan al proceso de fabricación, en lugar de hacerlo mediante el control en la inspección del producto terminado.

Debido a que microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 pueden ser resistentes a diversas condiciones ambientales tales como bajo pH, altas concentraciones de cloruro de sodio, y sobreviven al secado y al almacenamiento frío; el tratamiento térmico aplicado, la mezcla de sales de curado y el pH del producto, controlarán el riesgo de transmisión de estos patógenos y garantizarán la obtención de un producto inocuo al consumidor.

En base al diseño del Programa HACCP para la elaboración de la Mortadela y en beneficio de su correcto funcionamiento se recomienda: Implementar el Programa HACCP para la Mortadela tipo Especial; implementar análisis de detección e identificación de microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7) tanto en materia prima cárnica como en producto terminado, debido a la información epidemiológica disponible que relaciona este tipo de producto con esos riesgos (17-23); establecer un sistema de control de peligros físicos y químicos que incluya realizar análisis de determinación de plaguicidas en la materia prima cárnica y no cárnica y análisis de larvas y huevos de insectos en materia prima no cárnica; así mismo, se recomienda el

control de los piensos para los animales cuya carne es considerada un insumo para esta industria; establecer un programa de entrenamiento al personal involucrado en la implementación del Programa HACCP para mantenerlos actualizados; mantener al personal motivado, permitiendo que éste se involucre en todos los aspectos relacionados con la implementación del Programa y así comprenda los objetivos del trabajo. Después de un año de haberse puesto en funcionamiento el plan y realizadas las verificaciones del Programa HACCP correspondientes, se recomienda realizar éstas cada 6 meses en vez de cada 3 meses, a menos que se presenten problemas durante ese tiempo; establecer una campaña entre Distribuidores y Puntos de Venta de la conveniencia de mantener los productos refrigerados a la temperatura recomendada de forma constante, esto conllevaría a que el producto llegue al consumidor en condiciones inocuas; implementar el Sistema de HACCP en todos los productos elaborados en la Empresa, para así fortalecer la competitividad nacional e internacional.

REFERENCIAS

1. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Organización Institucional para el Aseguramiento de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos - El Caso de la Región Centroamericana. N° 11. San José, Costa Rica; 1999.
2. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Guía General para la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control. N° 1. San José, Costa Rica; 1999.
3. Comisión del Codex Alimentarius, Higiene de los Alimentos. Directrices para la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP). Anexo al CAC/RCP 1-1969, Rev. 3 (1997). Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Roma, Italia; 1998.
4. Comisión del Codex Alimentarius, Alinorm. Directrices para la aplicación del sistema de análisis de riesgos y de los puntos críticos de control (HACCP). Anexo al CAC/RCP 1-1969, Rev. 3 (1997). Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Roma, Italia; 1995.
5. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Organización Institucional para el Aseguramiento de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos - El Caso de la Región Andina. N° 10. San José, Costa Rica; 1999.
6. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma N° 3802:2002. Directrices Generales para la aplicación del Sistema HACCP en el sector alimentario. Fondonorma, Caracas, Venezuela; 2002.
7. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. Guidance for Minimizing the Risk of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in Beef Slaughter Operations. September 2002. (Disponible en: <http://haccpalliance.org/alliance/BeefSlaughterGuide.pdf>)
8. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. Washington, DC. Verification Procedures

- for the *Listeria monocytogenes*. Regulation and Microbial Sampling of Ready-to-Eat (RTE) Products for the FSIS Verification Testing Program. FSIS Directive 10,240.4,10/2/2003.
9. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma N° 1944. Mortadela. Fondonorma, Caracas, Venezuela; 1999.
 10. Comisión de la Comunidad Europea. Diario Oficial de la Comunidad Europea. Disposiciones en lo relativo a los autocontroles sanitarios de los productos pesqueros. Bruselas, Bélgica. Decisión de la Comisión de 20 de Mayo de 1994.
 11. Food and Drug Administration. FDA Backgrounder. HACCP: A State-of-the-Art Approach to Food Safety. October 2001. (Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/bghaccp.html>)
 12. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Hazard Analysis and Critical Control Point Principles and Application guidelines. Adopted August 14, 1997. (Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/nacmcfp.html>)
 13. Brown M. HACCP in the Meat Industry. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2000.
 14. Comisión del Codex Alimentarius, Alinorm. Directrices para la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y de los Puntos Críticos de Control (HACCP). N° 13. Anexo al Apéndice III. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Roma, Italia. 1995.
 15. Pierson M and Corlett DA. HACCP Principles and Applications. Ed. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 1992.
 16. IICA. Industria Cárnica - Guía para la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control. N° 5. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 1999.
 17. Del Rosario BA y Beuchat LR. Survival and Growth of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. J Food Prot. 58:105-107. 1995.
 18. Donnelly CW. *Listeria monocytogenes*. En: Foodborne Disease Handbook. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 1994.
 19. Doyle MP, Zhao T, Meng J y Zhao S. *Escherichia coli* O157:H7. En: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Ed. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville. A.S.M., Washington, DC. 1997.
 20. ICMSF. Microorganisms in Food 5. Microbiological specifications of food pathogens. First edition. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Ed. Blackie Academic and Professional, London, England. 1996.
 21. Luers M. Después de un perro caliente usted puede quedarse frío. Caracas, Venezuela. Quinto día, 5-12 de marzo de 1999.
 22. Rocourt J y Cossart P. *Listeria monocytogenes*. En: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Ed. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville. A.S.M., Washington, DC. 1997.
 23. Tuley L. The *E. coli* timebomb. Food Manufacture. 2:26. 1997.

Recibido: 29-05-2003

Aceptado: 20-01-2004

Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L.

Santiago Gallegos Tintoré, Jessé Pacheco Aguirre, David Betancur Ancona y Luis Chel Guerrero

Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida. México

RESUMEN. Las proteínas de los granos de leguminosas son fuente potencial de nutrientes valiosos, por lo cual son objeto de estudios para lograr su mejor aprovechamiento. Esto se hace más importante para aquellas proteínas provenientes de especies subexplotadas, por lo cual es necesario un conocimiento básico, previo a su utilización como ingrediente. El propósito de este trabajo consistió en determinar varias características estructurales y nutrimentales de las fracciones proteínicas de *Phaseolus lunatus*, separadas por solubilidad en diferentes agentes. La cantidad relativa de albúminas (ALB), globulinas (GLB), prolaminas (PRL) y glutelinas (GLT) fue 62,3, 34,8, 1,4 y 1,5%, respectivamente. En el perfil electroforético SDS-PAGE de las ALB y GLB se encontró siete bandas comunes en un intervalo de 10 a 95 kDa y 14 a 99 kDa, respectivamente. El perfil de aminoácidos mostró que la fracción rica en aminoácidos azufrados fue la de PRL (11,5 g/100 g proteína), encontrando el contenido de lisina, en la fracción de ALB, menor al esperado. El requerimiento de la FAO fue cubierto en las fracciones de GLB y GLT. En general el mejor balance de aminoácidos así como de digestibilidad (80%) lo presentó la fracción de GLB; sin embargo, tuvo una relación de eficiencia proteínica calculada (REP-C) de 0,11, menor que el de las ALB (0,97). El análisis calorimétrico, enseñó temperaturas de desnaturalización alrededor de 90°C para las fracciones ALB, GLB, GLU. La fracción de PRL no presentó transición térmica probablemente porque las proteínas se encontraban desnaturalizadas debido a las condiciones de extracción.

Palabras clave: *Phaseolus lunatus*, albúminas, globulinas, prolaminas, glutelinas.

SUMMARY. Extraction and characterization of soluble protein fractions from *Phaseolus lunatus* L seeds. Legume proteins as a potential source of valuable nutrients, are the object of several studies in order to obtain the best use. A basic knowledge becomes more important for those proteins from species not wholly utilized, before using them as food ingredients. The objective of this work was to determine several structural and nutritional characteristics of the protein fractions from *Phaseolus lunatus*, separated in different solvents. The relative amount of extraction for the albumins (ALB), globulins (GLB), prolamines (PRL), and glutelins (GLT) was 62,3, 34,8, 1,4 and 1,5%, respectively. The SDS-PAGE electrophoretic profile of both ALB and GLB, showed seven common bands in intervals from 10 to 95 kDa, and 14 to 99 kDa, respectively; the amino acids profile showed that PRL was the rich fraction in sulfurated amino acids (11,5 g/100 g protein); the content of lysine in the fraction of ALB was smaller than expected but the requirement of the FAO in the fractions of GLB and GLT was covered. In general, the fraction of GLB had the best balance of amino acids and digestibility (80%); however, it had a relationship of calculated protein efficiency ratio (C-PER) of 0,11, smaller than the ratio in ALB (0,97). The calorimetric analysis showed denatured temperatures around 90°C for the ALB, GLB, and GLU fractions. The PRL fraction probably did not present a thermal transition because the proteins were denaturalized by the extraction conditions. **Key words:** *Phaseolus lunatus*, albumins, globulins, prolamines, glutelins.

INTRODUCCION

Los granos de las leguminosas comestibles son en gran medida nutrimentalmente importantes, como la principal fuente de proteínas (20% al 40%) de bajo costo en la dieta del hombre. Los de *Phaseolus lunatus* se han convertido en un valioso objeto de estudio debido a su contenido de proteína cercano al 26% (1-3). Las proteínas vegetales pueden fraccionarse de acuerdo a su solubilidad, en albúminas (ALB), solubles en agua, globulinas (GLB), solubles en soluciones salinas, glutelinas (GLT), solubles en soluciones tanto ácidas como básicas y por último las prolaminas (PRL), solubles en soluciones alcohólicas (4). El método involucra diferentes

condiciones como temperatura, tiempo, concentración de proteína, pH y fuerza iónica, las cuales influirán tanto en el rendimiento de cada fracción obtenida como en la estructura de las proteínas que integran cada fracción. Por lo general, la mayor proporción de proteína en granos de leguminosas se encuentra en forma de GLB, seguida por ALB y en menor cantidad como GLT y PRL (5) y se ha encontrado que dependiendo de la proporción de cada una de las fracciones proteínicas en los granos, será la calidad nutrimental de la proteína total (6), así como las características fisicoquímicas y funcionales. En el caso de las semillas de *Vigna unguiculata*, leguminosa cultivada en el sureste de la república mexicana y poco aprovechada, como es el caso del *P. lunatus*, se ha

encontrado que cada una de las fracciones proteínicas extraídas es distinta con respecto a su composición de aminoácidos, siendo las fracciones de GLT y PRL las de más alto contenido de aminoácidos esenciales comparadas con las otras dos fracciones (6). Por ello, el tener un mayor conocimiento acerca de la variabilidad en la composición, propiedades funcionales y nutrimentales de los componentes proteínicos de las leguminosas, permitirá un mejor aprovechamiento de éstas, mediante su incorporación en sistemas alimenticios. Aún cuando se han realizado varios trabajos con *P. lunatus*, éstos han sido más bien en el ámbito tecnológico, para reducir o eliminar los efectos adversos de los componentes no nutritivos, generales y específicos, propios de las leguminosas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar varias propiedades estructurales de las fracciones proteínicas de *Phaseolus lunatus*, separadas mediante diferentes disolventes.

MATERIALES Y METODOS

Fraccionamiento de las proteínas de la harina

Se utilizaron 10 KK de granos de *P. lunatus* provenientes de la cosecha de febrero de 2000 del municipio del ejido La Libertad en Escárcega; Campeche, México. Los granos se limpiaron manualmente, se molieron a través de un molino Mikrós (malla 20), y posteriormente con un molino Cyclotec 1093 (Tecator Sweden) para la obtención de una harina más fina (malla 60). La extracción de las fracciones de ALB y GLB se llevó a cabo utilizando una modificación del método reportado por Barba de la Rosa et al. (7) de la siguiente manera: se preparó una dispersión de 50 g de harina de *P. lunatus* con una solución de Na_2HPO_4 0,05 M + NaCl 0,4 M + K_2SO_4 0,1434 M (1:1:1), en una relación 1:15 de harina / disolvente durante 1 h de agitación, centrifugando posteriormente a 15,805 xg durante 45 min, a 20°C. El sobrenadante (que contiene las fracciones de ALB y GLB) se dializó con agua destilada a 4°C hasta que la conductividad del agua de diálisis fuera cercana a su valor original. Posteriormente se centrifugó para separar la fracción de ALB (solubles) de la de GLB (insolubles). Ambas fueron secadas por liofilización a -45°C durante 24 h, en un equipo LABCONCO (No. 77510-00). El residuo de la extracción de ALB y GLB, se dispersó con isopropanol al 70% para la extracción de PRL, empleando una relación soluto / disolvente de 1:15, con 1 h de agitación, posteriormente se evaporó al vacío a 50°C y se secó por liofilización. La extracción de GLT se llevó a cabo dispersando el residuo de la extracción de PRL con una solución de NaOH 1 M a una relación 1:15 de soluto / disolvente, agitando durante 1 h. Posteriormente esta suspensión se centrifugó bajo las mismas condiciones que para el caso de ALB y GLB. El sobrenadante se dializó en un cuarto frío a una temperatura de 4°C, como

en el caso anterior y se centrifugó para la obtención de la fracción de GLT, la cual se secó por liofilización.

Se calculó el porcentaje de proteína extraída en cada fracción, utilizando la siguiente relación:

$$(\text{g de proteína extraída en la fracción} / \text{g de proteína en la harina}) \times 100$$

El contenido proteínico de la harina de *P. lunatus*, se calculó por el método de kjeldahl según la metodología de la A.O.A.C (14), empleando el factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25.

Cuantificación de proteína

El contenido de proteína de las fracciones se cuantificó mediante el método de Lowry et al. (8) con un kit de SIGMA (L-1013). Se pesaron de 1 a 4 mg de cada fracción dependiendo de la concentración de proteína en la muestra. Se agregó a cada tubo 500 μL de NaOH 1 N + 500 μL de agua destilada, se agitaron las muestras en un vórtex y se calentaron a baño María durante 1 min. Luego de 30 min se agregó a cada tubo 1 mL de reactivo preparado con 50 mL de Na_2CO_3 al 2% y 1 mL de reactivo B (CuSO_4 al 0,5% en tartrato de sodio y potasio al 1%), se dejó reaccionar 10 min, se agregaron 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma F-9252) diluido al 50% y se dejó reaccionar 30 min antes de leer la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman Mod. DU 650.

Como patrón se empleó una solución de albúmina sérica bovina (Sigma A-8531) a la concentración de 0,4 mg/mL.

Análisis fisicoquímico

A las fracciones obtenidas se les realizaron las siguientes determinaciones:

a) Calorimetría diferencial de barrido (CDB), de acuerdo con la metodología reportada por Martínez y Añón (9). Se pesaron 3 mg (b.s.) de muestra y se suspendieron en 10 μL de agua desionizada (30%). Se emplearon cápsulas herméticas (Perkin-Elmer No. 0219-0062), dejando estabilizar las muestras por lo menos 30 min a temperatura ambiente (25°C) y realizando la corrida con un equipo Perkin Elmer DSC-6 Pyris, programado con un flujo de calentamiento de 10°C /min en un intervalo de 35 a 130°C.

b) Electroforesis según Laemmli, (10). Se utilizaron como estándares proteínas de 103, 76, 49, 33,2, 28 y 19,9 kDa marca Bio-Rad y geles de poliacrilamida al 12,5%. El volumen de muestra inyectado fue de 5 a 10 μL dependiendo de la concentración de proteína en la muestra. El análisis electroforético se realizó con una corriente constante de 8-10 V/gel durante 5 h. Al término de ésta, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie G-250 (Fluka 27815) al 0,1% en agua: metanol: ácido acético en relación 4:1:5 (v/v /v) durante 1 h. Posteriormente fueron decolorados

utilizando una mezcla de agua - ácido acético - metanol en relación 5:1:2 (v / v / v) durante 12 h.

Evaluación nutricional

a) Perfil de aminoácidos, de acuerdo con el método de Khayat et al. (11), excepto el triptófano que se determinó según Dávila y Martínez (12).

Para el primer caso las muestras se hidrolizaron a vacío utilizando una solución de HCl 6 N durante 22 h a una temperatura de 110°C. Posteriormente el ácido se desechó y tanto las muestras hidrolizadas como el estándar interno de norleucina fueron tratadas con cloruro de dansilo. A continuación se tomaron 20 µL de las muestras y se inyectaron en una columna Lichrosorb C₁₈ (4,6mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, con un tamaño de partícula de 5µm) empleando acetonitrilo con 4 mL de H₃PO₄ al 5% por litro, así como Na₂HPO₄ 31 mM pH 7,6 para la elución de las muestras. El análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente y con una velocidad de flujo de 1 mL/min, el gradiente de acetonitrilo utilizado fue de 30 a 80%. Se utilizó un equipo HPLC (Waters, Milford, MA, EUA) integrado por un controlador mod. 600E, un inyector automático WISP mod. 712 y un detector UV-VIS. Los aminoácidos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los estándares dansilados marca Sigma (A-9656) y fueron cuantificados de acuerdo con el método de estándar interno.

Para la determinación de triptófano se preparó una curva estándar a partir de una solución patrón de 100 µg / mL del aminoácido Sigma (T-0254) en NaOH 1N. Se pesaron 10 mg de muestra y se pasó a tubos de ensaye de 20 mL, a cada uno de los tubos se le agregó 2,5 mL de solución de p-DMABA (p - dimetilaminobenzaldehído) Sigma (D-2004) al 0,05 % en agua destilada y posteriormente 11 mL de H₂SO₄ al 60%; se preparó un testigo que no contenía muestra. Los tubos se agitaron en un vórtex y se colocaron en la oscuridad durante 17 h. Posteriormente, se agregó a cada tubo 0,1 mL de nitrito de sodio al 0,05 % y se dejó reaccionar durante 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 590 nm.

b) Digestibilidad *in vitro* según Hsu et al. (13). Se prepararon 50 mL de una suspensión acuosa de material proteínico (molido y tamizado por una malla 80 con concentración de 6,25 mg/mL) y se ajustó el pH a 8 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N con agitación en un baño de agua a 37°C. Se prepararon 50 mL de una solución multienzimática que contenía una mezcla de tripsina (tipo IX Sigma T-0134 con 14.190 unidades BAEE/mg de proteína), quimotripsina (tipo II Sigma C-4129 con 60 unidades/mg de polvo) y peptidasa (grado III Sigma P-75000 con 40 unidades/g de polvo) por mL, se ajustó a pH 8 y esta solución se mantuvo en un baño de hielo. Una vez efectuado lo anterior, se añadieron 5 mL a la suspensión proteínica que se mantuvo

en agitación a 37°C. Se midió la caída de pH con un potenciómetro digital después de un período de 10 min. Se calculó la digestibilidad aparente *in vitro* (Y) a partir de la ecuación:

$$Y = 210,464 - 18,103X$$

Donde: X = pH de la suspensión proteínica inmediatamente después de 10 min de digestión con la solución multienzimática.

c) Cómputo químico corregido. Se calculó primeramente el cómputo químico según Friedman (14), empleando como referencia el patrón FAO / OMS (1991) para niños de 2 a 5 años; de acuerdo con la siguiente relación:

mg de aminoácidos indispensables en 1 g de la proteína evaluada/mg de aminoácido en 1 g de la proteína de referencia. El cómputo químico corregido se obtuvo multiplicando éste valor por la digestibilidad *in vitro* de la fracción proteínica, para cada aminoácido esencial.

d) REP-C (Relación de eficiencia proteínica calculada) de acuerdo con el método de la AOAC (15). Se utilizó el valor de digestibilidad *in vitro* y la cantidad (g) de aminoácido (AA)/100 g proteína de los siguientes: Lys, Met+Cys, Thr, Ile, Leu, Val, Phe+Tyr y Trp, considerando que en la combinación de Met+Cys y/o Phe+Tyr, el valor de la Cys y de la Tyr no pueden ser mayores al 50% de la suma total entre Met+Cys o Phe+Tyr, respectivamente.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía para el caso de las temperaturas y entalpías de desnaturalización, así como para la DIV y el REP-C, considerando como tratamientos a las diferentes fracciones. Posteriormente se efectuó una comparación múltiple de medias por medio de la prueba de Tukey de acuerdo con los métodos de Montgomery (16).

RESULTADOS Y DISCUSION

Fraccionamiento proteínico

El contenido de proteína en la harina de *P. lunatus* fue de 20,8%. La cantidad de proteína extraída para las cuatro fracciones se presenta en la Tabla 1. La fracción de albúminas (ALB) tuvo el mayor porcentaje relativo de 62,3, seguido por el de globulinas (GLB) con 34,8%. Este patrón difirió significativamente con el reportado por Gallegos (17), de 36% y 44% para las respectivas fracciones, quien trabajó con el mismo material, aunque previamente desgrasado y empleando como disolvente agua y cloruro de sodio al 10%, para la extracción secuencial de ALB y GLB respectivamente. Además del tipo de disolvente, también existe evidencia de que dependiendo del orden en que éstos se añadan puede

influir en los resultados. Este es el caso del amaranto, ya que una fracción denominada ALB 2 puede aparecer en la fracción de GLB o en la correspondiente a las GLT (18).

TABLA 1
Proporción de las fracciones proteínicas de la harina de *P. lunatus*

Fracciones	Proteína extraída (mg)	Proteína extraída (%)	% relativo
ALB	2746.7	26.4	62.3
GLB	1535.2	14.8	34.8
PRL	62.8	0.6	1.4
GLT	66.6	0.6	1.5
TOTAL	4411.3	42.4	100.0

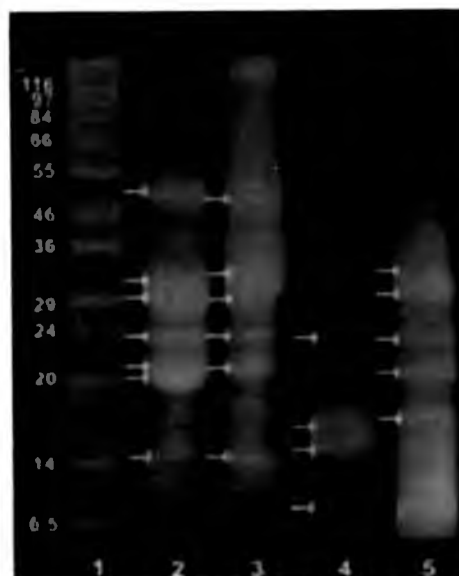
Es sabido que ciertos factores como el tamaño de partícula de la harina, la fuerza de agitación, la relación harinadisolvente, el número de extracciones por etapa, así como el estado fisiológico de la semilla, influyen en la proporción de las diferentes fracciones (19, 20). Esos factores, influyeron en la recuperación total de la proteína de *P. lunatus*, la cual fue de aproximadamente 42%, siendo menor al encontrado por Pereira y Costa (21) y Marquez y Lajolo (22) en *Phaseolus vulgaris* con rendimientos de extracción de 61,7% y 76% respectivamente. En estos trabajos se utilizó el método de Osborne (4) con algunas modificaciones, los primeros empleando una extracción secuencial de albúminas y globulinas y los segundos con extracción independiente de estas fracciones. Por otro lado Nikokyris y Kandylis (5), emplearon diferentes métodos para fraccionar las proteínas de 20 vegetales, entre cereales y leguminosas, encontrando una recuperación de proteína entre el 42% y 96%, dependiendo de la fuente vegetal, correspondiendo los menores valores a los casos en que se empleó el desgrasado.

Caracterización electroforética

En el análisis electroforético SDS - PAGE (Figura 1) se encontró para la fracción de ALB un número de bandas (quince) similar a la de GLB (catorce) teniendo mayor presencia siete de ellas en ALB (señaladas con flechas, Figura 1.2) con Masa molecular (MM) de 50, 33, 30, 24, 22, 20 y 14 kDa, seis en GLB con 57, 32, 24, 20, 18 y 14 kDa similares a las reportadas para *L. mutabilis sweet* (58,1, 33, 24,4, 19,3, 17,5, 14,9 kDa) (23). Las MM de los polipéptidos de las albúminas fueron similares a los encontrados en 6 variedades de garbanzo (10 a 91 kDa) estudiadas por Dhawan et al. (24). En el caso de las GLB se hallaron catorce bandas con MM entre 14 y 116 kDa de las cuales seis tuvieron mayor intensidad, éstas con MM de 49, 34, 31, 24, 21 y 14 kDa

(señaladas con flechas, Figura 1.3) algunas de ellas similares a las halladas por Acuña et al. (23) en *L. mutabilis sweet* (118,6, 63,9, 50,6, 47,8, 39,4, 33,6, 18,7, 14,9 kDa). Comparando los patrones electroforéticos de ambas fracciones, se pudo notar que por lo menos siete de las bandas presentaron una diferencia menor a 1 kDa, lo cual posiblemente indicó una separación deficiente de las proteínas.

FIGURA 1
Perfil electroforético SDS-PAGE de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*. 1: Estándar, 2: ALB, 3: GLB, 4: PRL, 5: GLT



En la fracción de PRL se identificaron bandas con MM de 22, 17, 16 y 7 kDa (señaladas con flechas, Figura 1.4) de las cuales solamente una, la de 22 kDa, se ha reportado en la misma fracción en otro trabajo realizado con *P. lunatus* en harina desgrasada (17), con lo que se puede suponer que el disolvente influyó significativamente en la estructura y composición de las proteínas como sugieren Shewry y Miflin (20), de tal manera que se modifica su solubilidad. La fracción de glutelinas GLT presentó cinco bandas con MM de 34, 31, 24, 21 y 17 kDa (señaladas con flechas, Figura 1.5). Además tuvo dos bandas tenues (45 y 31 kDa) y una de más de 116 kDa, así como una serie de bandas indefinidas con pesos menores a la de esta última.

Evaluación nutricional

Perfil de aminoácidos

El contenido de aminoácidos en las fracciones de ALB y GLB fue similar a lo reportado por Oshodi y Adeladum (2),

a excepción de la prolina (11,1 y 0,6 g/100g de proteína, respectivamente), que también se encontró en forma importante en la fracción de GLT (12,6 g/100 g de proteína). Contrariamente a lo reportado en la mayoría de las leguminosas (25), la fracción que resultó rica en aminoácidos azufrados fue la de prolaminas (PRL) (11,5 g/100 g proteína) en vez de las ALB (1,7 g/100 g proteína), cuyo contenido fue similar al encontrado para GLT (1,6 g/100 g proteína). El requerimiento de azufrados sugerido por la FAO (26), se observó cubierto, solamente en el caso de las PRL (11,5 g/100 g proteína), fracción en la cual se encontró una cantidad importante de ellos, aproximadamente 7 veces mayor que en la fracción correspondiente de *V. unguiculata* (Tabla 2) otra leguminosa subexplotada de las regiones tropicales del Sureste Mexicano.

El contenido de Lys en las ALB resultó menor que el esperado, pues se sabe que generalmente esta fracción es rica en este aminoácido (27); sin embargo, el requerimiento fue cubierto en las fracciones de GLB y GLT. En lo que respecta al contenido de Trp las cuatro fracciones proteínicas tuvieron valores menores a los recomendados por la FAO (26). En general, el mejor balance de aminoácidos esenciales lo tuvo la fracción de GLB, aunque en aminoácidos azufrados, fue la que en menor proporción los contuvo (Tabla 2); esto a diferencia de otra leguminosa como *Phaseolus mungo* (28), en donde la fracción de ALB mostró un mejor balance. Sin embargo, para el caso de *V. unguiculata* no se encontró diferencia en cuanto al aporte de aminoácidos entre ambas fracciones proteínicas (6).

TABLA 2

Composición de aminoácidos de las fracciones proteínicas de *P. lunatus* con las de *V. unguiculata* (g/100g de proteína)

Aminoácidos	ALB		GLB		PRL		GLT		Requerimiento FAO (1991)
	Pl	Vu	Pl	Vu	Pl	Vu	Pl	Vu	
Esenciales									
Lys	4,8	9,17	6,4	8,16	3,8	8,99	6,3	7,58	5,8
Trp	1,0	Nd	0,8	Nd	0,5	Nd	0,8	Nd	1,1
Phe + Tyr	10,0	8,10	11,2	9,15	5,2	10,36	10,4	11,53	6,3
Met + Cys	1,7	1,02	0,9	1,12	11,5	1,73	1,6	1,41	2,5
Thr	3,0	5,33	4,7	3,39	3,4	4,23	3,4	3,91	3,4
Leu	9,4	7,07	9,7	8,65	2,9	9,61	9,9	9,09	6,6
Ile	5,0	4,48	4,4	4,67	3,2	4,84	4,3	5,23	2,8
Val	4,1	5,04	5,4	5,21	2,5	6,62	4,4	6,34	3,5
No esenciales									
Asp + Asn	19,5	11,79	20,5	11,67	16,4	9,11	14,3	11,76	
Glu + Gln	12,2	12,11	11,8	16,51	11,6	11,07	12,0	17,24	
Ser	7,6	4,82	8,8	5,22	6,3	5,16	6,3	5,66	
His	1,7	2,96	1,6	3,76	2,2	3,65	2,0	3,72	
Gli	2,5	7,57	3,7	4,48	1,7	5,55	3,5	4,30	
Arg	4,1	7,69	5,5	7,87	17,3	5,87	4,9	4,89	
Ala	3,3	8,88	4,8	6,81	4,3	9,82	4,3	4,26	
Pro	11,1	3,98	0,6	3,33	7,7	3,39	12,6	3,08	

Nd: No determinado Pl: *P. lunatus* Vu: *V. unguiculata* (6).

Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* en las fracciones proteínicas de *P. lunatus*, resultó ligeramente baja con respecto a la harina cruda de *P. lunatus* reportada por Pérez (29) con 72,42%. La mayor digestibilidad *in vitro* (DIV) se obtuvo en las GLB (80%) equivalente a la reportada para *Phaseolus vulgaris* (79%) (30) y más alta que la encontrada *in vivo* para las GLB de haba (*Vicia faba*) con cerca del 70% (31). Los valores de las otras tres fracciones fueron muy similares y estadísticamente iguales entre si ($p > 0,05$) y todas con menor digestibilidad ($p < 0,05$) que la de GLB (Tabla 3). También en la leguminosa *Canavalia ensiformis*, se ha reportado (32) una mejor digestibilidad para la fracción de GLB (65,2%) que para las ALB (58,9%) y GLT (37,2%), la cual dependió del genotipo evaluado. Sin embargo, en todos los casos los valores fueron menores que los encontrados en el presente trabajo para las fracciones correspondientes de *P. lunatus*, siendo de 69, 67 y 66% para albúminas, glutelinas y prolaminas respectivamente. Esta diferencia en digestibilidad puede estar asociada a la estructura de las proteínas, ya que al tener ligeras diferencias en estructura terciaria y cuaternaria presentan diferente susceptibilidad a las enzimas proteolíticas (33), las cuales también pueden ser diferentes, acordes con la metodología de evaluación empleada.

Considerando en conjunto el aporte de aminoácidos esenciales y el valor de DIV, a través del REP-C (Tabla 3) se tuvo una mejor idea del valor nutritivo de cada una de las fracciones, ya que las PRL tuvieron el menor valor de este parámetro (-1,44) indicativo de una proteína de muy baja calidad (14), debido al alto desbalance de sus aminoácidos esenciales; siendo mejores y estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) en orden ascendente las ALB (0,97), GLT (0,53) y GLB (0,11). Un valor similar se informa para las ALB de *P. mungo* (1,13), aunque mejores resultados para las demás fracciones (1,27 y 1,34 y 1,53 para GLB, GLT y PRL, respectivamente), de acuerdo con Padhye y Salunkhe (28). Sin embargo, este valor de REP-C fue dependiente del método de cálculo, ya que también estos mismos autores (28) informaron valores de 0,38; 0,21; -0,14 y -0,42 para PRL, ALB, GLT y GLB respectivamente.

El mejor cómputo químico corregido para la Lis lo tuvo la fracción de GLB con 88%, siendo en general ésta la que presentó los mejores valores para casi todos los aminoácidos esenciales, obteniéndose el valor más bajo en la fracción de PRL (Tabla 4). Esta presentó también el menor cómputo químico corregido para Trp con un valor de 30%, siendo el más alto para ALB con 62%. Como es de esperarse en las proteínas de leguminosas, los aminoácidos azufrados en todas las fracciones, con excepción de la PRL con 304%, fueron los que arrojaron los menores valores de este parámetro, siendo de 54%, 47% y 43% respectivamente para GLB, ALB y GLT. Sin embargo, considerando el perfil de aminoácidos

reportado en la base de datos ESHA (34) y los valores de digestibilidad según Pérez (29), para la harina de *P. lunatus*, que incluye a todas las fracciones proteínicas, el valor del REP-C mejora para los azufrados hasta 69% y para el Trp hasta 78%, seguidos por Lys (84%) y Thr (92%), teniendo los demás aminoácidos esenciales calificaciones de más del 100%. Esto es un indicativo, de que las fracciones mayoritarias encontradas en la harina de *P. lunatus* (ALB y GLB), son las que proporcionarían un mejor valor nutritivo.

TABLA 3
DIV y REP-C de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*

Fracción proteínica	DIV %		REP-C <i>P. lunatus</i>
	<i>P. lunatus</i>	<i>C. ensiformis</i> (26)	
ALB	68,7 ^b	58,9	0,97 ^a
GLB	80,0 ^a	65,2	0,11 ^c
PRL	66,0 ^b	Nr	-1,44 ^d
GLT	67,4 ^b	37,3	0,53 ^b

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística (p<0,05)

Nr: no reportado, DIV: Digestibilidad *in vitro* REP-C: Relación de eficiencia proteínica calculada

TABLA 4
Cómputo químico corregido (%) de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*

Aminoácido	ALB	GLB	PRL	GLT
Lys	57	88	43	73
Trp	62	58	30	49
Phe + Tyr	109	142	54	111
Met + Cys	47	54	304	43
Thr	61	111	66	67
Leu	98	118	29	101
Ile	123	126	75	103
Val	80	123	47	85

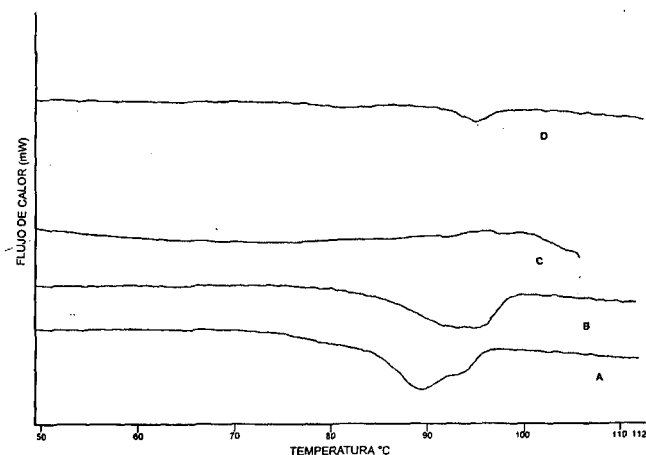
Calorimetría de barrido diferencial (CBD)

El análisis térmico indicó que la temperatura más alta de desnaturalización (Td) se encontró en la fracción de GLT (94°C) obteniéndose un valor similar aunque estadísticamente diferente (p<0,05) para GLB con 93,4°C y menor (p<0,05) respecto de ambas para ALB con 89,4°C (Figura 2). Las entalpías de desnaturalización presentaron valores de 1,5 ± 0,3 J/g, 14,3 ± 0,9 J/g y 23,7 ± 1,3 J/g, para GLU, GLB y ALB respectivamente, siendo todos los valores estadísticamente diferentes (p<0,05). El termograma de las ALB mostró un pequeño hombro (Figura 2, A) que pareció

corresponder por su valor de Td al de GLB, probablemente reflejando una asociación entre estas proteínas. La Td de GLB fue similar a la reportada para GLB de soya con 91°C (35), mostrando la posible existencia de más de una especie proteínica debido a su baja cooperatividad (más de 8°C) mayor que la calculada para las ALB (menos de 7°C). Debido a las altas temperaturas de desnaturalización que se encontraron, es muy probable que la conformación de los componentes de estas fracciones esté estabilizada por un gran número de interacciones hidrofóbicas, las cuales son de naturaleza endotérmica y por lo tanto, es requiere una mayor cantidad de energía para su desnaturalización (36). La fracción correspondiente a PRL no presentó transición térmica (Figura 2C) probablemente porque las proteínas se encontraban desnaturalizadas a causa de las condiciones de extracción.

FIGURA 2

Termogramas de las fracciones proteínicas de *P. lunatus*, A) albúminas, B) globulinas, C) prolaminas y D) glutelinas



CONCLUSIONES

La fracción con mayor presencia fue la de albúminas (ALB) con una presencia relativa de 62,3%, seguida por la de globulinas (GLB) con 34,8%. El perfil electroforético mostró en las ALB siete bandas mayoritarias con pesos entre 14 y 50 kDa y en las GLB catorce polipéptidos entre 14 y 116 kDa. Se hallaron varias bandas comunes entre ellas probablemente debido a una separación incompleta de las fracciones durante el fraccionamiento.

En general el mejor balance de aminoácidos esenciales se presentó en la fracción de GLB. La fracción que resultó rica en aminoácidos azufrados fue la de prolaminas (PRL) (11,5 g/100 g proteína) en vez de las ALB (1,7 g/100 g proteína), cuyo contenido fue similar al encontrado para

glutelinas (GLT) (1,6 g/100 g proteína), de tal manera que el requerimiento de azufrados sugerido por la FAO, se observó cubierto, solamente en el caso de las PRL (11,5 g/100 g proteína). El cómputo químico corregido global resultó de 54, 47 y 43% para el caso de GLB, ALB y GLT, que correspondieron a los aminoácidos azufrados y en el caso de las PRL fue de 29 debido a Leu. El contenido de aminoácidos indicó que las fracciones mayoritarias tuvieron diferencias importantes en el contenido de prolina, que fue de 12,2 y 1,6g/100 g de proteína para ALB y GLB, respectivamente.

La digestibilidad *in vitro* en las fracciones proteínicas de *P. lunatus* (66 a 69% resultó menor comparada con respecto a la de la harina cruda de *P. lunatus* con 72,42%, excepto la de las GLB con un 80%. Las PRL tuvieron el menor valor de REP-C (-1,44), siendo mejores en orden ascendente las ALB (0,97), GLT (0,53) y GLB (0,11), correspondiendo éstas a proteínas de baja calidad, excepto las ALB que resultan de calidad mediana, similar a la reportada para *P. mungo*.

En el análisis térmico, el termograma de las ALB mostró un pequeño hombro que pareció corresponder por su valor de Td al de GLB, probablemente reflejando una asociación entre estas proteínas. La Td de GLB fue similar a la reportada para GLB de soya con 91°C. La fracción de PRL no presentó transición térmica probablemente por que las proteínas se encontraban desnaturalizadas debido a las condiciones del método de extracción.

REFERENCIAS

1. Apata DF, Ologhobo AD. Biochemical evaluation of some Nigerian legume seeds. *Food Chem* 1994; 49: 333-338.
2. Oshodi AA, Adeladun MOA. Proximate composition, some nutritionally valuable minerals and functional properties of three varieties of lima bean (*Phaseolus lunatus* linn.) flour. *Int J Food Sci Nut* 1993; 43: 181-185.
3. Sullivan GH, Davenport LR. Dry edible beans: a New crop opportunity for the east north central region. En: Janick J, Simon JE. Editors. *New Crops*. New York Wiley, 1993. p. 585-588.
4. Osborne TB. *The vegetable protein*. New York. Longmans Green and Co. 1924.
5. Nikokyris PN, Kandyli K. Feed protein fractions in various solvents of ruminant feedstuffs. *J Sci Food Agric*. 1997; 75: 198-204.
6. Chan Chi-Wa y Philips RD. Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J Agric Food Chem* 1994;42:1857-1860.
7. Barba De La Rosa A, Guéguen J, Paredes-López O, Viroben G. Fractionation procedures, electrophoresis characterization, and amino acid composition of amaranth seeds proteins. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 931-936.
8. Lowry OH, German B, Kinsella JE. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J Food Sci* 1985; 50: 1715-1718.
9. Martínez EN, Añon MC. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 2523-2530.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 217: 680-685.
11. Khayat A, Peter K, Redenz Y, Lee AG. Quantitative determination of amino acids in food by high-pressure liquid chromatography. *Food Tech* 1982; 48: 46-50.
12. Dávila OG y Martínez AA. Caracterización de compuestos nutritivos, no nutritivos y calidad proteica. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED). Editorial Universitaria de Buenos Aires. 2000; pp. 89 - 91.
13. Hsu H, Vavak D, Satterlee L, Miller GA. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci* 1977; 42: 1269-1279.
14. Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources: A Review. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 6-29.
15. Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). *Official Methods of Analysis*. 15th Ed. Washington D.C. 1990; 684.
16. Montgomery DC. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. México. D.F. 1996; p. 277-421.
17. Gallegos TS. Perfil electroforético de las fracciones proteínicas de *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus* [Tesis de licenciatura]. Mérida, Yucatán, México; Universidad Autónoma de Yucatán: 2000.
18. Martínez EN, Castellani OF, Añon MC. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 3832-3839.
19. Pernollet JC, Mossé J. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins; seed proteins. Daussant, J; Mossé, J. and Vaughan, J. (Editores). London: Academic Press: 1983. p. 156-229.
20. Shewry PR, Mifflin BJ. Seed storage proteins of economically important. En: Pomeranz . editor. *Cereals Advances in Cereal Science and Technology*. USA 1985.
21. Pereira CA y Costa NM. Proteins of dehulled black beans: digestibility in conventional and germ free animals. *Rev. Nutr* 2002; 15(1):5-14.
22. Marquez UM, Lajolo FM. Composition and digestibility of albumin, globulins, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem*; 29:1064-1074.
23. Acuña O, Castillo P, Orbea M, Cherrez, M, Guerrero, M. Fraccionamiento de proteína de lupino por solubilidad y determinación de pesos moleculares (*Lupinus mutabilis sweet*). Simposio Iberoamericano sobre proteínas para alimentos (CYTED). Buenos Aires, Argentina; 1996. p. 239 - 49.
24. Dhawan K, Malhotra S, Dahiya BS, Singh D. Seed protein fractions and amino acid composition in gram (*Cicer arietinum*). *Plant Foods Human Nutr* 1991; 41:225-232.
25. Guéguen J, Cerletti P. Proteins of some legume seeds: soybean, pea, faba bean and lupin. En: Hudson JF (Editor) *Chapman Hill*; 1994. p. 145-197.

26. FAO/WHO. Protein quality evaluation. REPORT of joint FAO/WHO expert consultation. Food and nutrition. Paper No.51. Food Agriculture Organizations and the World Health Organization. Rome, Italy; 1991.
27. Sánchez V, Clemente A, Vioque J, Bautista J, Millán F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum L.*): chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chem 1999; 64:237-243.
28. Padhye VW, Salunkhe DK. Biochemical studies on black gram (*Phaseolus mungo L.*) seeds: amino acid composition and subunit constitution of fractions of the proteins. J Food Sci 1979; 44:606-610.
29. Pérez, VM. Caracterización fisicoquímica y funcional de concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Canavalia ensiformis*. Tesis de maestría, Facultad de ingeniería química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México; 1999.
30. Del Pino VH, Lajolo FM. Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris L.*) sobre la hidrólisis de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. Simposio iberoamericano sobre proteína para alimentos, Buenos Aires, Argentina, 1996. p. 169.
31. Carbonaro M, Grant G, Cappelloni M, Pusztai AX. Perspective into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds of storage proteins. J Agric Food Chem 1992; 48:742-749.
32. Ramírez MA y Ortiz de BL. Estudio de algunas características de las proteínas de canavalia. Arch Latinoam Nut 2000; 50(1): 69-73.
33. Deshpande SS, Damodaran S. Conformational characteristics of legume 7S globulins as revealed by circular dichroic, derivative U.V. absorption and fluorescence techniques. Int J Pept Protein Res 1990; 35:25-34.
34. ESHA. Genesis for windows. Databases. ESHA research, Salem; 1997.
35. Scilingo AA, Añon MC. Calorimetric study of soybeans protein isolates: effect of calcium and thermal treatments. J Agric Food Chem 1996; 44: 3751-3756.
36. Myers CD. Study of thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. En: Thermal analysis of foods. New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1990; p.16-50.

Recibido: 22-04-2003

Aceptado: 13-01-2004

Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente

Lorena R. Agostini, María J. Morón Jiménez, Adriana N. Ramón, Antonio Ayala Gómez

Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Salta. Argentina, Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. España

RESUMEN. El objetivo principal del trabajo fue determinar la capacidad antioxidante de los flavonoides en manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas, tomates y cebollas frescas y tratadas térmicamente: calor húmedo (hervido y vapor), seco (horno) y alta frecuencia (microondas). Se realizó la medición en un espectrofotómetro de fluorescencia y el análisis estadístico a través de la Varianza y Prueba de Duncan. Los resultados indican que la capacidad antioxidante de los flavonoides de las manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas, tomates y cebollas fue de 0,259, 0,267, 0,278, 0,165 y 0,223 μM Equivalente Trolox, disminuyendo estos valores luego del tratamiento térmico en mayor grado por calor seco a 0,128, 0,072, 0,077 y 0,048 μM Equivalente Trolox respectivamente y 0,146 μM Equivalente Trolox en la cebolla hervida. Los flavonoides presentaron mayor actividad antioxidante en estado fresco, disminuyendo al ser sometidos a los distintos tipos de calor (cocción).

Palabras clave: Capacidad antioxidante, flavonoides, tratamientos térmicos.

SUMMARY: Determination of the antioxidant capacity of flavonoids in fruits and fresh and thermally treated vegetables.

The main objective of the work was to determine the antioxidant capacity of the flavonoids in red apples with and without skin, strawberries, tomatoes and fresh onions and thermally treated: humid heat (boiled and vapor), dry heat (oven) and high frequency (microwaves). The measurement was carried out in a fluorescence spectroscopy and the statistical analysis through the Variance and Test of Duncan. The results indicate that the antioxidant capacity of the flavonoids of red apples with and without skin, strawberries, tomatoes and onions were of 0,259, 0,267, 0,278, 0,165 and 0,223 Equivalent μM Trolox. These values diminished after the thermal treatment at a higher degree by dry heat at 0,128, 0,072, 0,077 and 0,048 Equivalent μM Trolox respectively and 0,146 Equivalent μM Trolox in the boiled onion. The flavonoids showed a higher antioxidant activity in fresh state, and their activity diminished under heat (cooking).

Key words: Antioxidant capacity, flavonoids, thermal treatment.

INTRODUCCION

Tradicionalmente, los compuestos fenólicos, metabolitos secundarios de los vegetales (1) fueron considerados antinutrientes, debido al efecto negativo de uno de ellos, los taninos sobre la digestibilidad de las proteínas (2). Sin embargo, en la actualidad, se demostró que en particular, uno de los subgrupos: los flavonoides presentan actividades antioxidantes (3,4) ya que son excelentes dadores de electrones o hidrógeno con la formación de radicales intermedios relativamente estables (5). Este comportamiento está relacionado con la capacidad de quelar metales, inhibir la enzima lipooxigenasa y captar los radicales libres (6).

Los flavonoides o Vitamina P (7) están ampliamente distribuidos en el reino vegetal localizándose en la savia vacuolar de las células (8) como órganos aéreos, hojas, flores y raíces (9). Forman múltiples compuestos de bajo peso molecular (10) en su mayor parte en forma de glucósidos (11) como flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, taninos condensados o no hidrolizables entre otras

(10). La mayoría se caracterizan por ser hidrosolubles y estables al calor (11) siendo susceptibles a los cambios químicos (maduración de las frutas), físicos en el procesado de los alimentos: picado y trituración (estos forman parte de la organización tisular y de estructuras, que al romperse se lixivian y se destruyen parcialmente en contacto con el aire); y térmicos, ya que el calor excesivo altera los pigmentos de los alimentos (12).

El interés en la aplicación de los flavonoides y las evidencias clínicas de sus ventajas en la salud, determinó su importancia en la prevención (13) de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) (14), accidentes cerebro-vasculares, hepatitis, hipertensión, lupus, diabetes mellitus, fallo renal crónico, artritis reumatoidea (15), y retardo del envejecimiento (13).

Aparte de sus propiedades biológicas, poseen actividades farmacológicas y médicas (16) antiinflamatorias, antialérgicas (17) y bactericidas, vasodilatadores, entre otras (16). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad antioxidante de los flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron manzanas rojas (*Malus sylvestris*), fresas (*Fragaria spp.*), tomates (*Lycopersicon esculentum*) y cebollas (*Allium cepa*) en estado de maduración óptimo adquiridas en comercios locales de la ciudad de Salta, Argentina; seleccionadas según los requisitos de calidad y especificaciones del Código Alimentario Argentino (18).

Luego se procedió a lavar y eliminar partes no comestibles de las manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas, tomates y cebollas. Cada una fue dividida en 5 grupos de 150-200 gr., uno de ellos en estado fresco y los otros fueron tratados térmicamente según técnicas establecidas para la cocción de frutas y verduras (19,20), estandarizándose las temperaturas y tiempos de cocción correspondientes (Tabla 1).

TABLA 1

Temperatura y tiempo de cocción de las frutas y verduras sometidas a diferentes tratamientos térmicos

Muestras	Métodos	Temperaturas promedios (°C)		Tiempo (minutos)
		Interna	Medio de cocción	
Manzana con cáscara	Hervido	83	96	18-23
	Vapor	81	-	19-21
	Horno	88	230-260	28-29
	Microondas	95	-	2,30
Manzana sin cáscara	Hervido	81	95	13-15
	Vapor	83	-	15-20
	Horno	90	230-260	25-27
	Microondas	95	-	2
Frutilla	Hervido	82	95	6-7
	Vapor	76	-	3
	Horno	85	230-260	9-10
	Microondas	86	-	1,30
Tomate	Hervido	80	95	13-16
	Vapor	78	-	13-16
	Horno	86	230-260	18-22
	Microondas	88	-	1,30
Cebolla	Hervido	83	95	19-22
	Vapor	82	-	18-22
	Horno	81	230-260	29-31
	Microondas	96	-	2,5

Las muestras frescas y cocidas se homogeneizaron a fin de obtener los extractos de flavonoides según el método de Villar del Fresno (21).

Al final de la extracción se obtuvieron 4 fases: clorofórmica, acética, butanólica y acuosa. La capacidad antioxidante se midió a través de un Espectrofotómetro de Fluorescencia (W excitación 540 nm; W emisión 575 nm), previa termostatación de las cubetas de 3 ml a 37°C., según el método de Packer y Glazer (22). Se trabajó únicamente en la fase acética, descartándose las clorofórmicas y butanólicas

debido a que estas sustancias solas presentaron actividad antioxidante, y la acuosa porque no presentó una lectura positiva. Los datos obtenidos se expresaron en μM Equivalente Trolox, compuesto análogo de la Vitamina E (23).

Los resultados de las muestras se realizaron por triplicado y fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de Varianza (24) y Prueba de Duncan (25) y se presentan en un cuadro como promedio y desvío estándar, donde las letras distintas indican diferencias altamente significativas entre tratamientos y muestras.

RESULTADOS

Las manzanas frescas con y sin cáscaras no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, siendo los valores de 0,259 y 0,267 μM Equivalente Trolox respectivamente (Tabla 2), observándose una disminución de esta actividad en las tratadas térmicamente, sobretodo por la aplicación del calor seco (horno): 0,072 μM Equivalente Trolox en la manzana pelada y 0,128 μM Equivalente Trolox, con cáscara.

La mayor capacidad antioxidante en fresas fue en la muestra fresca (0,278 μM Equivalente Trolox), y la menor actividad, en las tratadas por calor seco (0,077 μM Equivalente Trolox), siendo igual que en las referidas anteriormente.

En el tomate en estado fresco, la actividad antioxidante fue mayor (0,165 μM Equivalente Trolox), en relación a los tratados por hervido (0,154 μM Equivalente Trolox), vapor (0,141 μM Equivalente Trolox), microondas (0,126 μM Equivalente Trolox) y horno (0,048 μM Equivalente Trolox).

La capacidad antioxidante de cebollas frescas fue de 0,223 μM Equivalente Trolox, siendo la menor actividad en las tratadas por hervido (0,146 μM Equivalente Trolox) y vapor (0,151 μM Equivalente Trolox), diferenciándose de los casos anteriores.

DISCUSION

La disminución de la capacidad antioxidante de los flavonoides de las manzanas frescas con y sin cáscaras por los tratamientos de cocción puede ser debida a la destrucción de los mismos causada por la temperatura y tiempo de cocción (calor seco: horno), temperatura interna del alimento (tratamiento por microondas) o por el tipo de calor aplicado.

El menor valor se obtuvo en la aplicación de calor seco (horno) por las temperaturas elevadas aplicadas y tiempo prolongado de cocción. Por otra parte, la diferencia observada entre las manzanas con y sin cáscaras horneadas puede ser debida a que la cáscara actúa como medio de protección durante la cocción del alimento evitando en lo posible las pérdidas de estos compuestos.

TABLA 2
Capacidad antioxidante de flavonoides de frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente
(μ M Equivalente Trolox por gr de muestras)

Ttos Frutas/verduras	Fresco	Hervido	Vapor	Microondas	Horno
Manzanas con cáscaras	0,259±0,006* ^a	0,237±0,007 ^{ab}	0,223±0,006 ^b	0,172±0,008 ^c	0,128±0,003 ^d
Manzanas sin cáscaras	0,267±0,004 ^a	0,247±0,005 ^{ab}	0,242±0,003 ^{ab}	0,212±0,008 ^b	0,072±0,003 ^c
Frutillas	0,278±0,006 ^f	0,226±0,005 ^e	0,228±0,002 ^e	0,138±0,004 ^h	0,077±0,005 ⁱ
Tomates	0,165±0,008 ^j	0,154±0,004 ^j	0,141±0,008 ^{ik}	0,126±0,004 ^k	0,048±0,007 ^l
Cebollas	0,223±0,005 ^m	0,146±0,007 ⁿ	0,151±0,007 ⁿ	0,198±0,005 ^m	0,158±0,007 ⁿ

*X ± D.E. p ≤ 0,01

Las letras iguales indican que no se presentan diferencias estadísticamente significativas

En diversos estudios se ha observado una disminución de los flavonoles como quercetina y kaempferol en frutas hervidas, por la producción de reacciones de oxidación (26) o la lixiviación de los compuestos en el agua de cocción (27).

Las fresas presentaron la mayor capacidad antioxidante, la cual disminuyó a partir de los tratamientos térmicos en especial por calor seco. Waterman y Mole (26) observaron que durante el hervido de frutas el contenido de quercetina y kaempferol (flavonoles) disminuyó sobre su cantidad original.

Con respecto a los tomates, estos presentaron igual tendencia que los casos mencionados anteriormente. Estudios realizados por Crozier, A., Lean, M. E. J., Morag, S. M. and Black, C. (28) demostraron una disminución de los flavonoides en tomates tratados por calor húmedo: hervido y según Hakkinen, Karenlampi, Mykkänen y Törrönen (27) esto se debe a una lixiviación de los compuestos en el agua de cocción.

La cebolla en estado fresco mostró mayor actividad en relación a las tratadas térmicamente, pero se diferenciaron de las restantes muestras estudiadas porque presentaron menor capacidad en las sometidas a calor húmedo con respecto al microondas y horno, lo que puede ser debido a que por las características propias del alimento, se produzca una mayor solubilización de estos compuestos.

Otros autores observaron que la quercetina libre que se encuentra en partes comestibles de cebollas crudas y cocidas, y conjugada presente en bulbos fueron resistentes a la degradación durante las operaciones domésticas normales (hervido y fritura) (29). Por otra parte, en tomates y cebollas se disminuyó el contenido de flavonoides en relación a su cantidad original (27), debido probablemente a una liberación de los compuestos en el medio de cocción (29). Además se observó que en ciertas verduras, una parte de los glucósidos de flavonoles individuales han sido retenido en los tejidos cocinados y el resto, lixiviado dentro del agua de cocción (30).

CONCLUSIONES

Las frutas y verduras frescas presentaron mayor capacidad antioxidante que las tratadas térmicamente, siendo la frutilla la que mayor valor obtuvo con respecto a las otras muestras frescas. El pelado de las manzanas rojas horneadas influyó sobre su actividad.

La capacidad antioxidante de flavonoides de las frutas y verduras disminuyó con la aplicación de los tratamientos térmicos, obteniendo el menor valor en las manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas y tomates tratadas por calor seco (horno); y en cebollas, por calor húmedo (hervido y vapor).

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Profesora Laura Moreno por su aporte en la traducción de este manuscrito, y al Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, España por su buena disposición para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Shahidi F, Nacz M. Foods phenolics. sources, chemistry, effects, application. Tecnnomic, publishing co. inc eds. Lancaster, Pennsylvania. USA; 1995. (original no consultado compendiado en Martínez - Valverde, J., Periago, M. J. y Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 2000; 50 (1): 5-18.
2. Martínez - Valverde J, Periago MJ y Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 2000; 50 (1): 5 -18.
3. Pratt DE. Natural antioxidant from plant material. In: Huang, M. T, Ho, C. T. and Li, C. Y, eds. Acs symposium series 507. Phenolic compounds in food and their effects on health II.

- Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society. Washington, D.C; 1992. p 54 - 68. (Original no consultado compendiado en Martínez - Valverde, J., Periago, M. J. y Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 2000, 50 (1): 5-18.
4. Pratt DE and Hudson BJS. Natural antioxidant no exploited commercially. In: Hudson, B. J. F. de Elsevier Applied Sciences. Food antioxidants. London; 1990. p. 171-180. (original no consultado compendiado en Martínez - Valverde, J., Periago, M. J. y Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 2000; 50 (1): 5-18.
 5. Nawar WW. Lípidos. En: Fennema, U. R. Química de los alimentos. (traducido del original en inglés por Calvo Rebollar, P.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España; 1993. p.223 - 227.
 6. Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants?. Nutritional Reviews. 1997; 55 (1): 396 - 398. (original no consultado compendiado en Martínez - Valverde, J., Periago, M. J. y Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 2000. 50 (1): 5-18.
 7. Salazar LE. Té verde. <http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/info/teverde.html>. 2002. pp. 1- 3.
 8. Braverman JBS. Introducción a la bioquímica de los alimentos. (traducido el original en inglés por Sanz Pérez, B. y Burgos González, J.) 2da edición. Barcelona. España: Editorial Omega, S. A.; 1978. p. 228, 229, 242-254.
 9. Villar del Fresno AM. Flavonoides. En Villar del Fresno, A. M. Farmacognosia General. Madrid. España: Editorial Síntesis; 1999. p. 209 -217.
 10. Hertog MGI, Hollman PCH and Van de Putte, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. J Agric Food Chem. 1993; 41:1242-1246. (original no consultado compendiado en Martínez - Valverde, J., Periago, M. J. y Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 2000. 50(1):5-18.
 11. Francis FJ. Pigmentos y otros colorantes. En: Fennema, O. R. Química de los alimentos (traducido del original en inglés por López Lorenzo, P.) Zaragoza. España: Editorial Acribia, S.A.; 1993. p. 635-648.
 12. Potters NM y Hotch Kiss JH. Ciencia de los alimentos. (traducido del original en inglés por Torija Isasa, M. E.). Zaragoza. España: Editorial Acribia, S. A; 1995. p. 44 - 45.
 13. Institute of food technologists (IFT). Antioxidantes: beneficios funcionales y nutraceuticos. La Alimentación Latinoamericana. 1998; 226: 55-58.
 14. Romero Ramos M. Efecto de la disminución de la capacidad de protección frente a oxidaciones sobre el sistema dopaminérgico nigro-estriado (tesis doctoral). España. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia; 1999. p. 1 - 205.
 15. Jiménez MD, Silvia. Radicales libres, amigos del envejecimiento. http://www.saludpr.com/radicales-ibres-amigos_del_envejecimiento.htm. 2001. pp.1-2.
 16. Guohua C, Sofic E and Ronald LP. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. structure activity relationships. Free radical biology and medicine. 1997; 22 (5): 749 - 760. (original no consultado compendiado en Martínez - Valverde, J., Periago, M. J. y Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch. Latinoamer. Nutr. 2000. 50 (1): 5-18).
 17. Borrego Ros F. Propiedades de los flavonoides cítricos. Naranja y salud. <http://www.ediho.es/horticom/news/22.html>. 2001. 1 p.
 18. De la Canal e Asociados, eds. Código Alimentario Argentino Actualizado. Cap. XI. Buenos Aires. Argentina; 1982.p.135-138.
 19. Garimaldi U. Los alimentos y su manejo. Ediciones H. A. Macchi. Buenos Aires. Argentina; 1968. p. 50-56.
 20. Jiménez MJ. Variación de peso, volumen y calidad sensorial de alimentos según los métodos de cocción. Consejo de Investigación. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Salta. Salta. Argentina; 1998. p 7-32.
 21. Villar del Fresno AM. Flavonoides. En Villar del Fresno, A. M. Farmacognosia General. Madrid. España: Editorial Síntesis; 1999. p. 209 -217.
 22. Packer L, Glazer AN. Methods in enzymology. Oxygen radicals and antioxidants. Part B. Vol. 186. San Diego. California: Editorial Academic Press. INC; 1990. p.161-168.
 23. Cano MJ, Ayala A, Murillo ML y Carreras O. Protective effect of folic acid against the oxidative stress produced in 21- day post-partum rats by maternal ethanol consumption during pregnancy and lactation period. Free Rad. RES. 2001;34:1- 8.
 24. Snedecor GH and Cochran WG. Métodos estadísticos (traducido del original en inglés por Reinos Fuller, J. A.). México (D. F.): Compañía Editorial Continental S. A.; 1971. p. 373-417.
 25. Duncan DB. Multiple range and multiple f test. Biometrics II; 1955. p. 1-42.
 26. Waterman PG, Mole S. In analysis of phenolic plant metabolites. The methods in ecology series. Lawton, J. H., Likens, G. E., eds. Blackwell Scientific Publications. Oxford; 1994. (original no consultado compendiado en Häkkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Mykkanen, H. M. and Torronen, A. R. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. J Agric Food Chem. 2000;48:2960 - 2965).
 27. Häkkinen SH, Karenlampi SO, Mykkanen HM and Torronen AR. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. J Agric Food Chem. 2000; 48:2960 - 2965.
 28. Crozier A, Lean MEJ, Morag SM and Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. J Agric Food Chem.1997;45:590 - 595.
 29. Price KR, Bacon JR and Rhodes MJC. Effects of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*allium cepa*). J Agric Food Chem. 1997; 45: 938 - 942.
 30. Price KR, Casuscelli F, Colquhoun IJ, Barnes KA and Rhodes MJC. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*brassica olearacea*) and their fate during cooking. J. Sci. Food Agric. 1998; 477: 468 - 472. (original no consultado compendiado en Häkkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Mykkanen, H. M. and Torronen, A. R. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. J. Agric. Food Chem. 2000; 48: 2960-2965).

Recibido: 13-06-2003

Aceptado: 05-03-2004

Caracterización de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva

Rafael Canett Romero, Ana Irene Ledesma Osuna, Rosario Maribel Robles Sánchez, Rafael Morales Castro, Liliana León-Martínez, Rosaura León-Gálvez

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México

RESUMEN. El objetivo del presente estudio fue evaluar la cascarilla de orujo de uva como posible ingrediente en la elaboración de productos para consumo humano, para lo cual se elaboraron galletas con cuatro niveles de adición de cascarilla (0, 5, 7.5 y 10%). Se determinó el contenido de humedad, proteína, cenizas, grasa, taninos y fibra dietaria tanto en cascarilla de orujo de uva como en galletas. Además, en galletas se llevó a cabo la medición de color, prueba de aceptación sensorial y las evaluaciones biológicas de Razón Neta de Proteína (NPR) y Digestibilidad Aparente (DA) y Verdadera de Proteína (DV). Se encontraron altos contenidos de fibra dietética y cenizas tanto en cascarilla de orujo como en galletas. La fibra dietética total aumentó al incrementarse la adición de cascarilla de orujo. El contenido de taninos encontrado en cascarilla disminuyó significativamente en galletas. Se observó un alto nivel de agrado de las galletas en la evaluación sensorial, no mostrando diferencias significativas entre los cuatro niveles de adición. En la medición de color, la intensidad del color fue aumentando a medida que se agregó más cascarilla. Con respecto a las evaluaciones biológicas, al aumentarse el porcentaje de adición de cascarilla de orujo fueron disminuyendo los valores de NPR, DA y DV, afectándose en mayor grado el NPR, aunque estadísticamente, esta diferencia no fue significativa. Se concluye, que es posible utilizar, la cascarilla de orujo de uva como ingrediente para la elaboración de galletas con alto contenido de fibra dietaria y un nivel de agrado aceptable.

Palabras clave: Orujo de uva, galletas con fibra, fibra dietaria.

SUMMARY. Characterization of cookies made with deseeded grape pomace. The objective of this study was to evaluate deseeded grape pomace as a potential ingredient to elaborate some food products. Cookies were made with flour containing four levels of deseeded grape pomace (0, 5, 7.5 and 10%). Moisture, protein, ashes, fat, tannins and dietary fiber contents were determined in both the deseeded of grape pomace and the cookies. Besides, color, sensorial acceptability and biological evaluations of Net Protein Ratio (NPR), Apparent Digestibility (AD) and True Digestibility (TD) of Protein were determined to the cookies. Substantial amounts of dietary fiber and ashes were found in both the deseeded grape pomace and the cookies. Total dietary fiber increased while adding more deseeded grape pomace. Cookies were well accepted as observed in the sensory evaluation, showing no significant differences among the four levels of deseeded grape pomace addition. The addition of deseeded grape pomace imparted a darker color to the cookies. The dark color was greater in the samples containing more fiber which was indicated by the lower L color value. Regarding nutritional analysis, the higher the deseeded grape pomace addition, the lower the NPR, AD, and TD values. The NPR was affected in greater degree, although these differences were not significant. It is possible to use deseeded grape pomace as an ingredient to make high fiber cookies with acceptable sensorial attributes.

Key words: Grape pomace, fiber cookies, dietary fiber.

INTRODUCCION

En México, Sonora es el principal estado productor de uva a nivel nacional, con aproximadamente el 64% de la superficie sembrada dedicada a este cultivo. De esto, aproximadamente el 60% se destina al cultivo de uva industrial la cual es utilizada para la elaboración de aguardiente (1).

El orujo de uva es un subproducto que se obtiene del proceso de vinificación, el cual consiste en someter al fruto a un proceso de extracción del jugo, que junto con la pulpa y cascarilla se depositan en tanques de fermentación; posteriormente se separa el jugo fermentado de toda la materia sólida que lo acompaña y por un lado se obtiene el jugo que pasa a destilación y por otro el orujo de uva; el cual está

constituido en peso por un 45% de cascarilla, 30% de semilla y 25% de palillo. Se ha estimado que el orujo constituye el 12% del peso de la uva fresca y presenta un contenido de humedad de 65% (2).

Dependiendo de la región de cultivo y de las variedades de uva, el orujo puede presentar la siguiente composición química: de 12%-14% de proteína, 17-35% de fibra cruda, 5-9% de grasa y 5-9% de minerales (3).

En recientes años ha habido un mayor interés en la recuperación y reutilización de subproductos del proceso de vinificación (2,4). Estudios realizados han mostrado que el orujo de uva puede ser utilizado como fuente de fibra dietética para consumo humano (4,5) ya que la cascarilla de orujo presenta altos contenidos de este componente.

Con el creciente énfasis dado a los requerimientos de fibra en la dieta, ha habido un mayor interés en incorporar exitosamente fibra en productos alimenticios (6,7). La ingestión de fibra dietética esta asociada con una variedad de efectos fisiológicos, los cuales dependen de las propiedades fisicoquímicas de los diferentes tipos de fibras. Estos efectos incluyen incremento en el peso y volumen de la materia fecal, disminución en los niveles de colesterol plasmáticos, disminución en la respuesta glicémica a los alimentos, efecto en el riesgo de cáncer de colon y recto y la disminución en la disponibilidad biológica de nutrientes (8-14).

Se ha investigado la incorporación de fibra de varias fuentes en la elaboración de galletas (6,15,16), asimismo se ha observado que la adición de fibra puede alterar algunas propiedades de los alimentos tales como apariencia, sabor y textura (7). Las gomas y pectinas en la formulación de muchos alimentos modifican o controlan los efectos texturales de los mismos (17).

La incorporación de fibra en fórmulas panaderas se ha utilizado con gran éxito; se ha encontrado que la adición de 25% de fibra (salvados de trigo o maíz), no produce alteración significativa en la textura de bollos, ni en su aceptación (18). En la formulación de alimentos el criterio más importante en la selección del nivel de incorporación de cualquier ingrediente, es la contribución que éste tendrá en la aceptación del producto final (19).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue determinar si la cascarilla de orujo de uva podría ser incorporada en niveles moderados en la elaboración de galletas sin mostrar un efecto perjudicial en el nivel de aceptación de la galleta, así como en el valor nutricional de la proteína.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de la materia prima

Orujo de uva de la variedad *carignan noir* fue obtenido de un procesador de aguardiente local. La toma de muestras se realizó de manera aleatoria durante el período de cosecha. El orujo de uva se sometió a un proceso de secado en un secador tipo túnel con circulación de aire a contracorriente y temperatura de $55 \pm 5^\circ\text{C}$ por un periodo de tres a cinco horas. Se separaron los componentes anatómicos del orujo de uva (cascarilla, semilla y palillo) utilizando un limpiador de granos (marca Clíper, modelo M2BC) y posteriormente de manera manual. Sólo se utilizó la cascarilla de orujo de uva y la molienda se realizó en un molino experimental (marca Laboratory Mills, modelo 1100) obteniéndose un tamaño de partícula de 60 mesh.

Formulación y preparación de galletas

Las galletas fueron preparadas de acuerdo al micrométodo III (20). La formulación básica incluyó harina de trigo, azúcar,

manteca vegetal, leudantes químicos, sal, vainilla y agua suficiente para obtener una masa de consistencia óptima. La cascarilla de orujo de uva fue sustituida por 0, 5, 7.5 y 10% de la harina (peso/peso) en la formulación base. El mezclado de los ingredientes se llevó a cabo en un mezcladora (marca Hobart Troy, OH, modelo AS200T) y el horneado se realizó en un horno eléctrico (marca Cárcamo S.A., México, D.F.) por 12 minutos a una temperatura de 205°C .

Análisis químicos

Las pruebas químicas se realizaron tanto en cascarilla de orujo de uva como en galletas, siguiendo las técnicas propuestas por la AOAC, 1990 (21). Los análisis químicos realizados incluyeron las determinaciones de humedad (método 925.10), proteína (método 950.36), grasa (método 922.06) y cenizas (método 923.03). Además se determinó el contenido de taninos (22) y fibra dietética total (FDT) así como las fracciones soluble (FDS) e insoluble (FDI) (23).

Medición de color

El color de las galletas fue medido usando un colorímetro de triestímulo (marca Minolta, modelo CR10) para obtener los valores de L (luminosidad), a (rojo) y b (amarillo); donde $L = 100$ (blanco), $L = 0$ (negro), $+a =$ rojo, $-a =$ verde, $+b =$ amarillo y $-b =$ azul. Las muestras de galletas enteras fueron colocadas en cajas petri, y se obtuvieron los valores de L, a y b de la superficie de la galleta. Se analizaron cinco muestras de cada tratamiento y cada tratamiento fue realizado por duplicado.

Evaluación sensorial

Las evaluaciones sensoriales en galletas fueron realizadas usando 30 jueces consumidores. Se evaluó el nivel de aceptación de las galletas utilizando una escala hedónica de 7 puntos, donde 7 = me gusta mucho, 6 = me gusta, 5 me gusta ligeramente, 4 = ni me gusta ni me disgusta, 3 = me disgusta ligeramente, 2 = me disgusta y 1 = me disgusta mucho (24).

Evaluaciones biológicas

Para estas evaluaciones se utilizaron ratas albinas tipo Sprague-Dawley de 21 días de nacidas y con un peso 45-55 g. Se formaron grupos de cuatro ratas (dos hembras y dos machos) cada uno por duplicado para cada dieta. Los animales fueron colocados en jaulas de acero inoxidable por un período de 2 semanas; se proporcionó alimento y agua *ad libitum* a todos los animales y se mantuvieron a 25°C con ciclos de 12 horas luz-oscuridad; se registró el peso de cada animal, el consumo de alimento y se colectaron las excretas. Con esta información se calcularon los indicadores de calidad de proteína de Razón Neta de Proteína (NPR), y Digestibilidad Aparente (DA) y Verdadera (DV) de proteína.

Las dietas experimentales consistieron en galleta molida y desgrasada para cada uno de los niveles de sustitución de cascarilla. Cada dieta fue suplementada con 4% de minerales, 1% de vitaminas y 8% de grasa (21). Se elaboró una dieta control de caseína para cada nivel de cascarilla. Las dietas control se ajustaron al contenido de proteína y fibra presente en las dietas experimentales utilizando celulosa como fuente de fibra y caseína como fuente de proteína; el contenido de vitaminas, minerales y grasa fue el mismo que en las dietas experimentales (Tabla 1). Se evaluó el efecto del consumo de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva sobre los indicadores de calidad nutricional de proteína de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$NPR = \frac{(\text{ganancia en peso} + \text{pérdida en peso del grupo con dieta libre de nitrógeno})}{\text{gramos de proteína consumida}}$$

$$DA = \frac{\text{nitrógeno consumido} - \text{nitrógeno fecal}}{\text{nitrógeno consumido}} \times 100$$

$$DV = \frac{\text{nitrógeno consumido} - (\text{nitrógeno fecal} - \text{nitrógeno fecal metabólico})}{\text{nitrógeno consumido}} \times 100$$

Donde el nitrógeno fecal metabólico se obtiene mediante la utilización de un grupo de animales alimentados con una dieta libre de nitrógeno (25).

TABLA 1
Composición de ingredientes en las dietas experimentales*

Dieta	Harina de galletas	Aceite de maíz	Celulosa	Minerales	Vitaminas	Caseína	Almidón
Caseína 0%	-	8	2.5	4	1	9.2	75.3
Caseína 5%	-	8	5.5	4	1	9.2	72.3
Caseína 7.5%	-	8	6.1	4	1	9.2	71.7
Caseína 10%	-	8	8.5	4	1	9.2	69.3
Galleta 0%	87	8	-	4	1	-	-
Galleta 5%	87	8	-	4	1	-	-
Galleta 7.5%	87	8	-	4	1	-	-
Galleta 10%	87	8	-	4	1	-	-

*Los valores están expresados como g/100 g de dieta.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental unifactorial totalmente aleatorizado, donde el único factor fue el contenido de cascarilla de orujo de uva y sus niveles fueron 0, 5, 7.5 y 10%. A los datos obtenidos del diseño experimental se les realizaron análisis de varianza y la comparación de medias de los tratamientos se llevó a cabo con la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete computacional SAS (26).

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis químicos en cascarilla de orujo de uva

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis químico realizado en cascarilla de orujo de uva. Se observa que este subproducto presenta altas cantidades de fibra dietaria, proteína y cenizas; sin embargo, el contenido de grasa es bajo. Se ha reportado en investigaciones previas que es en la semilla y no en la cascarilla donde se encuentra el mayor contenido de grasa de este subproducto, cuyo valor oscila entre 16 y 18% (2,27). La fibra dietética fue el componente que se encontró en mayor proporción en la

cascarilla de orujo de uva, donde la fracción insoluble fue predominante; similares resultados fueron obtenidos por Sandoval, 1995 (5). El contenido de taninos es más abundante en semilla que en cascarilla (28,29), se han reportado contenidos de taninos de 36.4 mg/g de muestra en orujo entero (semilla y cascarilla) y 49.87 mg/g de muestra para el caso de la semilla sola (28); lo anterior plantea una limitación al tratar de utilizar este subproducto completo (semilla y cascarilla) como componente de productos alimenticios, debido a las características de sabor que imparten estos compuestos, sin embargo, recientemente este tipo de compuestos han tomado gran interés debido a su capacidad antioxidante lo cual trae implicaciones benéficas para la salud (30).

Análisis químico en galletas

El contenido de proteína entre los diferentes niveles de adición de cascarilla no mostró diferencias significativas, esto se debe a que tanto la harina de trigo como la cascarilla de uva presentaron contenidos de proteína semejantes, por lo que la sustitución de un ingrediente por el otro no modifica el contenido final de la galleta, sin embargo, el valor

nutricional de la misma si se vio afectado.

El nivel de cenizas en galletas fue estadísticamente mayor cuando la adición de cascarilla de uva fue en aumento lo cual se debe al alto contenido de material mineral presente en este subproducto (Tabla 3). Por lo que respecta a taninos solo se detectaron taninos en el mayor nivel de adición de cascarilla; sin embargo, debido al efecto de dilución estas cantidades fueron considerablemente bajas con respecto al contenido original en la cascarilla de uva.

El aporte más significativo al suplementar las galletas con cascarilla de orujo de uva fue el contenido de fibra. Se encontraron altos contenidos de FDT y FDI en las galletas con mayor nivel de adición de cascarilla de orujo de uva (Tabla 4), de igual manera que en cascarilla la fibra insoluble fue la fracción predominante de la fibra dietética total. La importancia de la inclusión de fibra en la dieta a pesar de su indigestibilidad radica en sus efectos benéficos para la salud (8,11,14, 19,31), motivo por el cual es importante incluirla como parte de la dieta de una manera fácil y práctica.

TABLA 2

Análisis químicos realizados en cascarilla de orujo de uva*
(g/100 g)

	Contenido
Humedad	5.59 ± 0.06
Proteína †	14.72 ± 0.18
Grasa †	1.07 ± 0.03
Cenizas†	8.83 ± 0.08
Carbohidratos†	76.77
Taninos (mg de catequina/g de muestra)	19.41 ± 1.61
Fibra dietética total †	54.42 ± 1.55
Fibra dietética insoluble†	49.00 ± 0.48
Fibra dietética soluble†	5.42 ± 1.08

* Valores son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar

† Valores expresados en base seca.

‡ Determinados por diferencia.

TABLA 3

Análisis químico en galletas formuladas con diferentes niveles de cascarilla de orujo de uva*

Nivel de cascarilla (g/100 g)	Humedad (g/100 g)	Proteína	Grasa (g/100 g)†	Cenizas	Taninos (mg catequina/g muestra)
0	7.70±1.00a ‡	8.46±0.60a	21.69±0.92a	1.38±0.04c	ND §
5	4.85±0.25a	8.21±0.52a	21.44±0.54a	1.90±0.06b	ND
7.5	6.55±0.77a	7.98±0.13a	21.92±0.76a	2.27±0.08a	ND
10	6.50±0.33a	8.26±0.66a	22.27±0.44a	2.35±0.05a	1.20±0.12

* Valores son el promedio de tres determinaciones, ± desviación estándar.

† Valores reportados en base seca.

‡ Dentro de una misma columna, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

§ ND = No detectado

TABLA 4

Fibra dietética insoluble (FDI), fibra dietética soluble (FDS) y fibra dietética total (FDT) en galletas* (g/100 g)

Nivel de cascarilla (g/100 g)	FDI	FDS	FDT
0	1.90±0.25c†	2.03±0.06a	3.93±0.26b
5	4.34±0.20b	2.04±0.39a	6.38±0.50a
7.5	4.82±0.77b	2.27±0.23a	7.09±1.00a
10	7.09±0.35a	2.69±0.22a	9.78±0.50a

* Valores son el promedio de cinco determinaciones, ± desviación estándar.

† Dentro de una misma columna, promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

Medición de color

La intensidad del color (Tabla 5) fue estadísticamente mayor en las galletas que contenían altas cantidades de cascarilla de orujo de uva, lo cual se vio reflejado en los valores más bajos de **L**. Las diferencias en los valores de **a** y **b** en las galletas con respecto al control, de manera similar que el parámetro **L** pudieran deberse a la adición de cascarilla en la formulación y posiblemente a reacciones tipo maillard y caramelización que se favorecieron durante el horneado. Similares estudios (6,32) han reportado que la adición de diferentes fuentes de fibra en la formulación de galletas producen un pardeamiento considerable en el producto terminado.

TABLA 5
Color el galletas con diferentes niveles de adición de cascarilla de orujo de uva*

Nivel de adición de cascarilla (g/100 g)	Valores de color †		
	L	a	b
0	42.04±3.93a‡	7.34±1.19a	19.70±3.75a
5	28.34±1.93c	3.52±0.66b	8.77±3.43b
7.5	26.66±2.41b	3.29±0.42b	4.99±2.72b
10	23.58±2.07b	2.81±0.53b	5.62±3.87b

* Valores son el promedio de diez determinaciones, ± desviación estándar.

† L = valores de luminosidad, 100=blanco, 0=negro, +a = rojo, -a = verde, +b = amarillo, -b = azul.

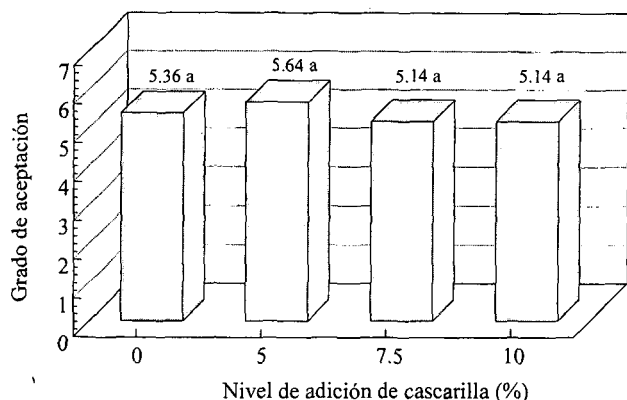
‡ Dentro de una misma columna, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

Evaluación sensorial

La adición de cascarilla de orujo de uva no afectó significativamente la aceptación de galletas (Figura 1). Se presentó una alto grado de aceptación, es decir, los valores dados por los evaluadores estuvieron entre los puntos 5 y 6 en la escala hedónica que corresponden a me gusta ligeramente y me gusta, respectivamente. Resultados similares se han reportado al utilizar la cascarilla de uva para elaborar diferentes productos alimenticios (33).

FIGURA 1

Grado de aceptación de galletas elaboradas con diferentes niveles de cascarilla de orujo de uva



Análisis nutricional

Las dietas control de caseína presentaron valores mas altos de NPR, DA y DV de proteína que las dietas elaboradas con galleta para todos los niveles de fibra y proteína (Tabla 6). La DA y DV de una proteína de buena calidad (caseína) en las dietas no se afectó por el nivel de adición de fibra, sin embargo, el valor de NPR si disminuyó significativamente. Se ha observado que la adición de orujo de uva como fuente de fibra en la dieta no afecta la ganancia en peso o el consumo del alimento, pero sí la excreción fecal de proteína disminuyendo la digestibilidad de ésta (34). Gallaher y Shneeman (35) reportaron que en el caso de fuentes ricas en fibra, la proteína presente, contribuye al nitrógeno fecal, de esta manera una baja digestibilidad proteica puede ser debida en parte a la proteína asociada a la fibra, la que por lo general es indigerible, así como a la presencia de taninos condensados, los cuales se ha demostrado, se unen a proteínas inhibiendo la actividad de las enzimas digestivas, afectando su digestibilidad (30,36).

TABLA 6
Razón neta de proteína (NPR) y digestibilidad aparente (DA) y verdadera (DV) de proteína en galletas

Dieta	NPR	DA (g/100 g)	DV (g/100 g)
Caseína 0%	3.85 a*	88.95 a	91.46 a
Caseína 5%	3.85 a	88.95 a	91.46 a
Caseína 7.5%	2.87 b	91.03 a	93.29 a
Caseína 10%	3.12 b	90.13 a	92.56 a
Galleta 0% cascarilla	1.67 c	79.99 b	86.34 b
Galleta 5% cascarilla	1.32 c	66.90 c	71.14 c
Galleta 7.5% cascarilla	1.26 cd	69.32 c	73.17 c
Galleta 10% cascarilla	0.76 d	62.94 d	66.72 d

* Dentro de una misma columna, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05).

CONCLUSIONES

La cascarilla del orujo de uva presenta altas cantidades de proteínas, cenizas y fibra dietética, constituyentes potencialmente utilizables para consumo humano. Es posible aplicar la tecnología para incorporar la cascarilla de orujo de uva en la elaboración de galletas con características sensoriales aceptables. Los mejores niveles de adición de cascarilla fueron 5 y 7.5% los cuales no disminuyeron significativamente la digestibilidad de proteína y razón neta de proteína, además, presentaron buena aceptación general en el análisis sensorial, así como cantidades significativamente mayores de fibra dietética.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sistema de Investigación del Mar de Cortés (SIMAC-CONACyT) y a la Fundación Produce Sonora, A.C. por el apoyo económico brindado para la realización de la presente investigación.

REFERENCIAS

- Valenzuela CE y Marquez CA. Dinámica de la Viticultura Comercial. Libro Técnico No.1. Producción Vitícola. Hermosillo, Sonora. 1993;3-11.
- Fantozzi P and Betschart AA. Grape seed: A potential source of protein. *J Am Oil Chem Soc.* 1981;58(12):1027-1031.
- Amerine MA and Berg HW. The Technology and Wine Making. The AVI Publishing Inc. Westport. Connecticut, U.S.A. 1982;77-126, 644-660.
- Valiente C, Arrigoni E, Esteban RM and Amado R. Grape pomace as a potential food fiber. *J Food Sci.* 1995; 60(4):818-820.
- Sandoval NL. Estudio de orujo de uva como posible fuente de fibra dietaria para consumo humano. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. 1995.
- Artz WE, Warren CC, Mohring AE and Villota R. Incorporation of corn fiber into sugar snap cookies. *Cereal Chem.* 1990;67(3):303-305.
- Shafer MAM and Zabik ME. Dietary fiber sources for baked products: comparison of wheat brans and other cereal brans in layer cakes. *J Food Sci.* 1978;43(2):375-379.
- Rosado JL. Fibra dietética; definición, propiedades fisicoquímicas y fisiológicas y sus implicaciones en la salud. Departamento de Fisiología de Nutrición. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 1991.
- Anderson JW. Dietary fiber in nutrition management of diabetes. Chapter 23. In: *Dietary Fiber. Basic and Clinical Aspects.* G.V. Vahouny and D. Kritchevsky (editors). Plenum Press, New York. 1987.
- Kritchevsky D. Dietary fiber and arteriosclerosis. Chapter 17. In: *Dietary Fiber. Basic and Clinical Aspects.* G.V. Vahouny and D. Kritchevsky (editors). Plenum Press, New York. 1987a.
- Kritchevsky D. Fiber and cancer. Chapter 29. In: *Dietary Fiber. Basic and Clinical Aspects.* G.V. Vahouny and D. Kritchevsky (editors). Plenum Press, New York. 1987b.
- Chen W.JL and Anderson JW. Hypercholesterolemic effect of soluble fibers. Chapter 18. In: *Dietary Fiber. Basic and Clinical Aspects.* G.V. Vahouny and D. Kritchevsky (editors). Plenum Press, New York. 1987.
- Schneeman BO and Lefevre M. Effects of fiber on plasma lipoprotein composition. Chapter 20. In: *Dietary Fiber. Basic and Clinical Aspects.* G.V. Vahouny and D. Kritchevsky (editors). Plenum Press, New York. 1987.
- Hunninghake DB, Miller, VT, La Rosa JC, Knosian B, Brown V, Howard W.J, Diserio FJ and O'Connor RR. Hypocholesterolemic effects of a dietary fiber supplement. *Am J Clin Nutr.* 1994;59(5):1050-1054.
- Vratanina D and Zabik ME. Dietary fiber sources for baked products: Bran in sugar snap cookies. *J Food Sci.* 1978;43(5):1590-1594.
- Gorczyca CJ and Zabik ME. High fiber sugar snap cookies containing cellulose and coated cellulose coated cellulose products. *Cereal Chem.* 1979;56(6):537-540.
- Schneeman BO. Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. *Food Technol.* 1986;40(2):104-110.
- Polizzoto LM, Tinsley AM, Weber CW and Berry JW. Dietary fiber in muffins. *J Food Sci.* 1983;48(1):111-118.
- Gordon DT. Functional properties vs physiological action of dietary fiber. *Cereal Foods World.* 1989;34(7):517-525.
- Finney KF, Morris VH and Yamazaki WT. Micro versus macro cookie baking procedures for evaluating the cookie quality of wheat varieties. *Cereal Chem.* 1950;27(1):42-49.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Vol. I y II. Published by the Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, Virginia, U.S.A. 1990.
- Price ML and Butler LG. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J Agric Food Chem.* 1977;25(6):1268-1273.
- Prosky Y, Nils-George, ASP, Schweizer TF, Furda I and Devries, J. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products. interlaboratory study. *J. Assoc Off Anal Chem.* 1988;71(5):1017-1023.
- Anzaldúa-Morales A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acribia, S.A. 1994;133-134.
- Canett-Romero, R. Robles-Sánchez RM y Ledesma-Osuna AI. Manual de técnicas nutricionales de calidad de proteína *in vivo*. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. 2001.
- SAS. "SAS user's guide". Version 6.08. Statistical Analysis System Institute, Raleigh, INC. 2000.
- Fantozzi P and Betschart AA. Development of grapeseed protein. *J Am Oil Chem Soc.* 1979;56(3):457-459.
- Saura-Calixto F, Goñi I, Mañas E and Abia R. Klason lignin condensed tannins and resistant protein as dietary fiber constituents determination in grape pomaces. *Food Chem.* 1990;39:299-309.
- Fernandez A.JA. Extracción de taninos condensados en semilla de orujo de uva. Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora. 1997.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-333.
- Cronin FJ and Shaw AM. Summary of dietary recommendations for healthy americans. *Nutr Today.* 1988;23(6):26-34.
- Jeltema MA, Zabik ME and Thiel L.J. Prediction of cookie quality from dietary fiber components. *Cereal Chem.* 1983;60(9):227-230.
- Flora LF, Beuchat LR and Rao VNM. Preparation of a shelf-stable, intermediate moisture food product from muscadine grape skins. *J Food Sci.* 1979; 44(3):854-856.

34. Carron NM, García AA, Goñi I and Saura-Calixto F. Nutritional and physiological properties of grape pomace as a potential food ingredient. *Amer J Enol Vitic.* 1997;38(3):329-332.
35. Gallaher D and Schneeman BO. Effect of dietary fiber on protein digestibility and utilization. Chapter 4. In: *Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*. Genea Spiller (editor). CRC Press. Boca Raton, FL. 1993.
36. Bravo L, Saura-Calixto F and Goñi I. Effects of dietary fiber and tannins from apple pulp on the composition of faeces in rats. *Br J Nutr.* 1992;67:463-473.

Recibido: 04-07-2003

Aceptado: 13-02-2004

El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes

Cynthia Cristina Arcila-Lozano, Guadalupe Loarca-Piña, Salvador Lecona-Urbe y Elvira González de Mejía

PROPAC (Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Departamento de Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana, University of Illinois, Urbana-Champaign

RESUMEN. El orégano comprende varias especies de plantas que son utilizadas con fines culinarios, siendo las más comunes el *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y el *Lippia graveolens*, originario de México. Entre las especies de *Origanum* se encuentran como componentes principales el limoneno, el β -cariofileno, el p-cimeno, el canfor, el linalol, el α -pineno, el carvacrol y el timol. En el género *Lippia* pueden encontrarse estos mismos compuestos. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento. Algunas propiedades de los extractos del orégano han sido estudiadas debido al creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos. El orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. Estas características son muy importantes para la industria alimentaria ya que pueden favorecer la inocuidad y estabilidad de los alimentos como también protegerlos contra alteraciones lipídicas. Existen además algunos informes sobre el efecto antimutagénico y anticarcinogénico del orégano sugiriendo que representan una alternativa potencial para el tratamiento y/o prevención de trastornos crónicos como el cáncer.

Palabras clave: Orégano, *Lippia*, aceites esenciales, aroma, timol, antioxidante, actividad antimicrobiana.

SUMMARY. Oregano: Properties, composition and biological activity. The oregano spice includes various plant species. The most common are the genus *Origanum*, native of Europe, and the *Lippia*, native of Mexico. Among the species of *Origanum*, their most important components are the limonene, β -cariofilene, p-cymenene, canfor, linalol, α -pinene, carvacrol and thymol. In the genus *Lippia*, the same compounds can be found. The oregano composition depends on the specie, climate, altitude, time of recollection and the stage of growth. Some of the properties of this plant's extracts are being currently studied due to the growing interest for substituting synthetic additives commonly found in foods. Oregano has a good antioxidant capacity and also presents antimicrobial activity against pathogenic microorganisms like *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, among others. These are all characteristics of interest for the food industry because they may enhance the safety and stability of foods. There are also some reports regarding the antimutagenic and anticarcinogenic effect of oregano; representing an alternative for the potential treatment and/or prevention of certain chronic ailments, like cancer.

Key words: Oregano, *Lippia*, essential oil, aroma, thymol, antioxidant, antimicrobial activity.

INTRODUCCION

El nombre "orégano" comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico a "especioso". Las hojas secas del *Origanum vulgare*, nativo de Europa y del *Lippia graveolens*, planta nativa de México son de uso culinario común (1). El género *Origanum* pertenece a la familia *Lamiaceae*, mientras que el *Lippia graveolens*, a la familia *Verbenaceae*. Las Tablas 1 y 2 presentan la clasificación taxonómica de las distintas especies (2) y las características de los diferentes tipos de orégano. La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; motivos que lo han convertido en un producto de exportación. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estima

que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos, por ejemplo los terpenoides, para sus cuidados primarios de salud.

En base a criterios morfológicos, el género *Origanum* se ha clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos (3). Lawrence (4) informa que son cuatro los grupos de orégano comúnmente usados con propósitos culinarios: el griego (*Origanum vulgare* spp. *Hirtum* (Link) *letsvaart*), el español (*Coridohymus capitatus* (L.) *Hoffmanns* y *Link*), el turco (*Origanum onites* L.) y el mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) (5). La composición y la cantidad de los metabolitos secundarios de estas plantas dependen de factores climáticos, la altitud, la época de cosecha, y su estado de crecimiento. Por lo anterior el estudio de dichos factores y su influencia en su cultivo es importante para su mejor aprovechamiento y explotación (6-11). El

p-cimeno y los derivados fenólicos carvacrol y timol han sido encontrados en diversas hierbas y especias incluyendo el orégano. Estas sustancias son monoterpenoides representativos de un pequeño grupo de compuestos aromáticos que la

naturaleza produce vía la ruta del mevalonato seguido por compuestos aromáticos que involucran al ácido shiquímico (12).

TABLA 1
Clasificación taxonómica de las especias

Angiospermae	Dicotyledoneae	Sympetalae	Tubiflorae	Labitae	Albahaca, Mejorana, Menta, Orégano , Romero, Salvia, Tomillo
				Solanaceae	Chile, Pimentón, Pimiento rojo
				Pedaliaceae	Ajonjolí
				Vervenaceae	Orégano Mexicano
			Campunulatae	Compositae	Camomila, Chicoria, Estragón
		Arquiclamydeae	Piperales	Piperaceae	Cubeba, pimienta larga, pimienta
				Myristicaceae	Macis, Nuez moscada
			Ranales	Lauraceae	Laurel, Canela, Casia
				Magnoliaceae	Anís estrella
			Rhoadales	Cruciferae	Mostaza, Wasabi
			Myrtiflorae	Myrtaceae	Pimienta inglesa, Clavo
			Umbelliflorae	Umbelliferae	Anís, Comino, Apio, Chirivía, Cilantro, Comino, Eneldo, Hinojo, Perejil
	Monocotyledoneae	Liliiflorae	Liliaceae		Ajo, Cebolla
			Iridaceae		Azafrán
		Scitamineae	Zingiberaceae		Cardamomo, Jengibre
		Orchidales	Orquidaceae		Vainilla

Adaptado de Nakatani (2).

TABLA 2
Características de varios tipos de orégano

Nombre científico	Nombre común	Hojas	Altura	Suelo	Luz solar	Color de las flores
<i>Origanum syriacum</i>						
<i>Origanum maru</i>	Orégano Sirio	Perennial	12"-24"	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum onites</i>	Orégano de Creta	Perennial	2'		Sol	Blanco
<i>Origanum dictamnus</i>	Dittany de Creta	Tender perennial	12"-15"	Bien drenado	Sol	Rosado
<i>Origanum saso</i>	Orégano enano rosado	Perennial				
<i>Origanum vulgare aureum</i>	Mejorana dorada trepadora	Perennial	3"-8"	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum vulgare hirtum</i>	Orégano Griego	Perennial	12"-18"	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum vulgare humilen cv</i>	Orégano Griego enano		4"		Sol	
<i>Origanum laevigatum "Herrensausen"</i>	Orégano Herrenhausen	Perennial	2'	Bien drenado	Sol	Purpura
<i>Origanum laevigatum "Hopleys"</i>	Orégano Púrpura	Perennial	12" - 15"	Bien drenado	Sol	Purpura
<i>Origanum sipyleum</i>	Orégano rosados					
<i>Origanum majoricum</i>	Orégano Italiano	Perennial	12"-15"	Humedo, bien drenado	Sol y sombra	Blanco
<i>Origanum kaliteri</i>	Orégano Kaliteri	Tender perennial	12"-24"	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum rotundifolium x dictamnus</i>	Orégano algodónoso					
<i>Origanum rotundifolium cv</i>	Orégano hermoso		15"	Seco a humedo	Sol	Rosado
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano Mexicano	Tender perennial	2' - 3'	Bien drenado	Sol	Blanco
<i>Origanum majorana</i>	Orégano Siciliano o mejorana dulce	Tender perennial	8"-10"	Humedo, bien drenado	Sol	Blanco

Composición química del orégano

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales (13). Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (14). En *O. vulgare* se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico y vainillínico (15). Los ácidos ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico y vainillínico están presentes en *O. onites* (16). Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, canfor, linalol, α -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo (13). En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridooides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido; y tres iridooides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-*p*-coumaroil y 6'-O-cafeoil (17). También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina (18,19). Las Figuras 1 y 2 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano y la Figura 3 muestra un método general para la extracción de las fracciones activas.

FIGURA 1

Estructura química de los principales componentes en orégano

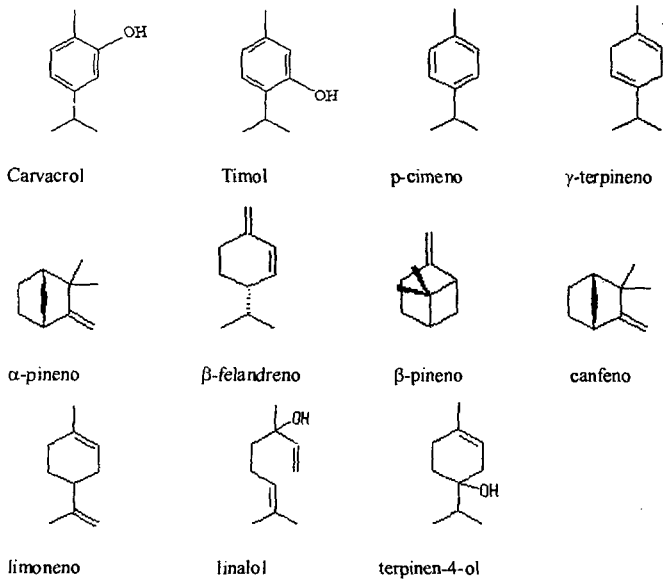


FIGURA 2

Estructura química de los principales flavonoides en orégano

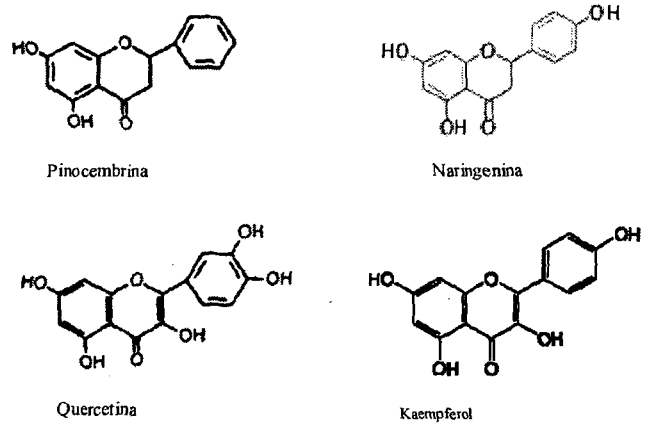
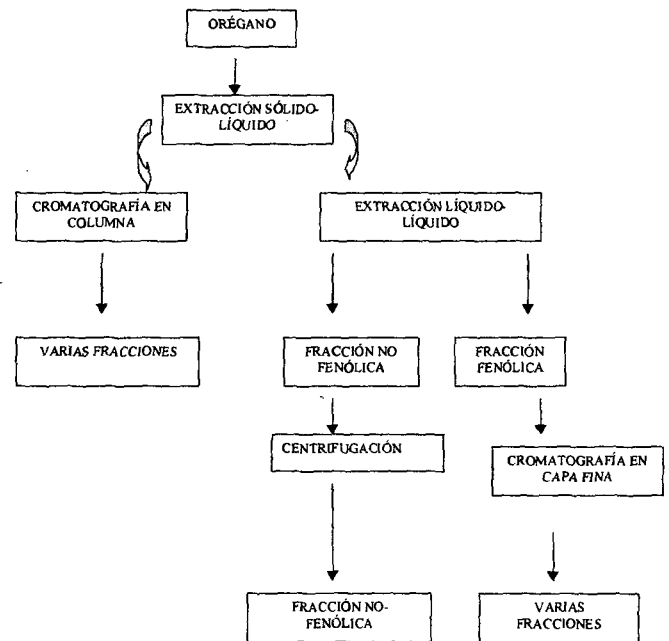


FIGURE 3

Método general de la extracción de fracciones activas de orégano (adaptado de 37, 103)



Los monoterpénicos, compuestos volátiles con olores intensamente pungentes, son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas (12). Estructural y biológicamente son muy diferentes, llegándose a clasificárseles hasta en 35 grupos (20). Los principales quimiotipos de la especie *O. vulgare* son el carvacrol y el timol cada una con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (21).

La subespecie *O. vulgare ssp. Hirtum* es la más estudiada, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, ya que este último tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca varía entre 2% y 6% (5,15). Este porcentaje se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo (5), y por la época de recolección, siendo este más bajo en el otoño (6).

Los compuestos mayoritarios encontrados en *O. vulgare ssp. Hirtum* son el carvacrol, timol, ρ -cimeno y γ -terpineno, aunque en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes (5,15,22). Estos componentes también se han encontrado en *O. dictamnus* (23) y se sabe

que otras especies como *O. scabrum* y *O. microphyllum* contienen alrededor de 28 y 41 compuestos diferentes, respectivamente (22). Los investigadores cubanos caracterizaron tres especies de orégano y concluyeron que se recomendaba la producción de *Lippia micromera* (24). La Tabla 3 presenta algunos de los compuestos principales en cada tipo de orégano. En el aceite del orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol. Se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca un decremento en el contenido de carvacrol (5). De igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides γ -terpineno y ρ -cimeno están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los dos fenoles (6).

TABLA 3
Composición química de *Origanum* y *Lippia*

Nombre Científico	Principales componentes	Referencias
<i>O. vulgare</i>	Ácido o-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p -hidroxibenzoico, ácido vainillínico, ácido rosmarínico.	5, 6, 15, 16, 53
<i>O. dictamnus</i>	Mirceno, α -terpineno p -cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol, β -cariofileno	25
<i>O. onites</i>	p -cimeno, timoquinona, carvacrol	16
<i>O. glandulosum</i>	Ácido ferúlico, ácido cafeico, p -hidroxibenzoico, ácido vainillínico	99
<i>L. multiflora</i>	p -cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol	64
<i>L. graveolens</i>	1, 8-cineol, linalool, β -cariofileno, (Z) b-farneseno, germacreno D, (Z)-nerolidol	17, 19, 13,32,100
<i>L. sidoides</i>	ácido carioptosídico, naringenina, pinocebrina, β -felandreno, carvacrol, 1,8-cineol, p -cimeno, metil , timol, timol.	83
	metil 3, 4-dihidroxibenzoato, lapachenol, quercetin, luteolin, lipsidoquinona.	

En el aceite del orégano silvestre cultivado en hidroponia y adicionado de fósforo se han identificado 46 componentes. En este caso, los principales compuestos fueron el carvacrol (29%-73%) y el p -cimeno (11%-42%). Al mismo tiempo se observó un incremento en el porcentaje de p -cimeno y un decremento de carvacrol cuando se comparó con el aceite de plantas enriquecidas con nitrógeno (25).

Métodos de extracción y análisis de aceites esenciales

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas por lo que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites (26). En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes se derivan del ácido mevalónico y se les clasifica en monoterpenoides y sesquiterpenoides (18). La Figura 4 muestra los factores que afectan la calidad del aceite esencial de orégano (27). En este aspecto existe aún controversia. Algunos autores señalan

que la gran variabilidad en la composición química de los aceites esenciales es debida, sobre todo, al origen del material más que a la influencia del medio ambiente (28, 29). Otros autores otorgan un papel más preponderante al medio ambiente, sobre todo en lo referente a densidad de planta sembrada, estación del año en el corte y a la cantidad de agua usada en el riego (30), o incluso a la cantidad de luz artificial o natural usada en el cultivo de la planta en invernadero (31).

Los métodos convencionales utilizados para la extracción de aceites esenciales son la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos. En los últimos años ha crecido el interés por la extracción supercrítica y subcrítica con dióxido de carbono como solvente. Este gas es ideal ya que no es tóxico ni explosivo y es fácil de remover de los productos extraídos (32,33). Los rendimientos de extracción generalmente van desde el 1.8% (34) hasta el 5.6%. En cuanto a su composición se han logrado identificar hasta 56 compuestos, y se han encontrado diferencias cuantitativamente significativas en sólo dos fenoles

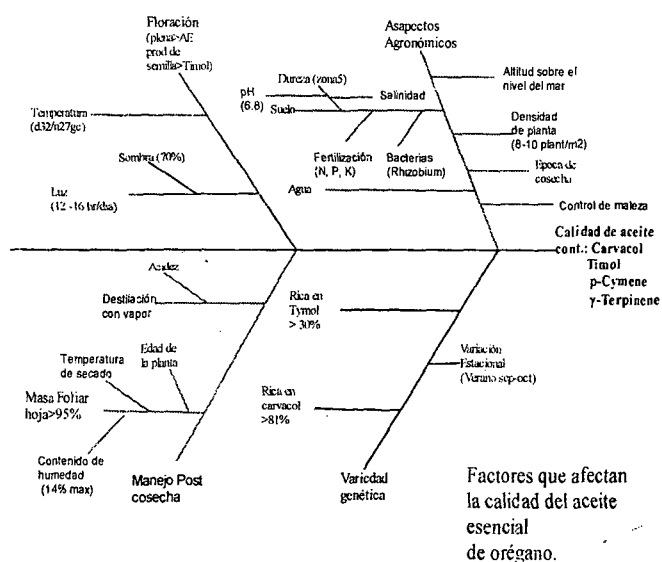
isoméricos, carvacrol (0.1-56.6%) o fenol no-cristalizable y timol (7.9-53.6%) o fenol cristalizable; incluyéndose sus precursores biosintéticos el γ -terpineno y el p-cimeno (5). Algunos autores señalan que el aceite con mayor cantidad de carvacrol es el preferido (34). Se han encontrado contenidos de timol superiores al 30% en muestras de orégano (*L. graveolens* Kunth) recolectadas en el estado de Jalisco (35). Vernin *et al.* (36) obtuvieron el aceite esencial de *Lippia graveolens* HBK por hidrodestilación y encontraron 45 compuestos que constituyeron el 92-93% del aceite. Los componentes principales fueron carvacrol (71%) y timol (5%).

TABLA 4
Actividades biológicas del orégano

Actividad	Genero	Referencias
Antioxidante	<i>Origanum</i> <i>Lippia</i>	15, 42, 47, 48, 53, 54, 99-102 55
Antimicrobiana	<i>Origanum</i> <i>Lippia</i>	22, 23, 56-58, 97 59
Antiparasítica	<i>Lippia</i>	64, 65, 66
Estrogénica	<i>Origanum</i>	69, 90
Antigenotóxica	<i>Origanum</i> <i>Lippia</i>	75, 76, 78-81, 85-89 82-84
Insecticida	<i>Origanum</i>	73, 74

FIGURA 4

Factores que afectan la calidad del aceite esencial de orégano (27)



Actividad biológica de los componentes del orégano

Antioxidante

En la Tabla 4 se menciona que una de las principales actividades biológicas del orégano es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Oreganum* (37). La función antioxidante de diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención en relación con el papel que tienen en la dieta en la prevención de enfermedades (38). Los compuestos antioxidantes son importantes porque poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, enfermedad cardiovascular y diabetes. Los antioxidantes como los tocoferoles, los carotenoides, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos se consumen a través de los alimentos. En algunos estudios de especias se han estado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos (39).

El efecto antioxidante de las plantas aromáticas se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (40). Entre las diferentes variedades de orégano se han encontrado altos niveles de antioxidantes (>140 mmol/100 g) (41). El potencial antioxidante de los extractos de orégano ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilo, con los métodos de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, atrapamiento de HOCl y por la prueba de la rancidez. En todas estas pruebas, los extractos de orégano han mostrado ser efectivos, en algunos casos a niveles superiores a los exhibidos por el propil galato, BHT y BHA (42). Sin embargo, sus aplicaciones industriales son limitadas debido al aroma y sabor que pueden conferir a los alimentos donde se aplicarían, por lo que se requiere de investigación en procesos de deodorización (43). La actividad antioxidante depende del tipo y polaridad del solvente extractante; por ejemplo, los antioxidantes obtenidos con agentes lipofílicos son más efectivos en emulsiones (43). El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol (44). Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) (37,45,46). En nuestro laboratorio se evaluó el potencial antioxidante del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) obtenido de hojas secadas a la sombra y al sol, los resultados se muestran en la Tabla 5. La mejor actividad antioxidante, con el método del β -caroteno, se obtuvo en el aceite que proviene de las hojas de orégano secadas a la sombra, siendo ésta dosis dependiente y mayor que el BHT (27). Otros métodos que han sido empleados para medir el grado de oxidación son la técnica de espectroscopía de resonancia electrónica (se basa en las etapas tempranas del proceso de oxidación); el del radical libre, el cual relaciona el efecto antioxidante en la iniciación del proceso oxidativo; y el de depleción de oxígeno, en el cual se mide el efecto antioxidante en la etapa de propagación. *O. vulgare* y *O. onites*, sometidos a esta última determinación, demostraron alta actividad antioxidante en la etapa de propagación (índice antioxidativo 0.064 y 0.050, respectivamente) (47).

TABLA 5
Actividad antioxidante y anti-radical del aceite esencial
de orégano Mexicano
(*Lippia graveolens* Kunth)

Muestra	Actividad antioxidante Método del β -caroteno ^a			
	AOX ¹	AA ²	ORR ³	AAC ⁴
Control (DMSO)	9.92 ^a	0	1.0	0.0
Trolox				
125 mg/ml	5.49 ^b	92.37 ^a	0.08 ^a	536.33 ^a
250 mg/ml	11.04 ^c	94.86 ^b	0.05 ^b	756.98 ^b
BHT				
110 mg/ml	31.63 ^d	83.76 ^c	0.20 ^a	490.87 ^c
Orégano mexicano secado a la sombra				
8 mg/ml	79.12 ^e	52.62 ^d	0.48 ^d	249.51 ^d
16 mg/ml	82.63 ^e	50.17 ^d	0.50 ^d	136.56 ^e
32 mg/ml	44.32 ^f	67.96 ^e	0.32 ^e	355.93 ^f
64 mg/ml	41.17 ^f	73.23 ^e	0.30 ^e	337.08 ^f
Secado al sol (38°C)				
10 mg/ml	29.47 ^g	82.49 ^f	0.18 ^f	399.38 ^g
20 mg/ml	20.01 ^h	87.82 ^g	0.12 ^g	472.13 ^h
40 mg/ml	15.10 ⁱ	90.04 ^g	0.10 ^h	432.60 ⁱ
80 mg/ml	6.69 ^j	85.83 ^f	0.14 ⁱ	617.33 ^j

^a Letra diferente en la columna indica diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

¹ Actividad antioxidante, ² % de la inhibición de la coloración de β -caroteno, ³ Relación antioxidante, ⁴ Coeficiente de actividad antioxidante, ⁵ Actividad anti-radical. (Adaptado de 27).

Las hierbas y especias como el orégano son también una fuente potencial de vitamina C y de otros compuestos antioxidantes como los carotenoides. En el orégano (*O. vulgare*) se ha encontrado un contenido de ácido ascórbico de $26 \pm 3 \mu\text{M/g}$, de luteína de $206 \pm 6 \mu\text{g/g}$ y de zeaxantina de $44 \pm 1 \mu\text{g/g}$ (48).

El efecto antioxidante de los extractos metanólicos del orégano se debe a la presencia de ácido cafeico y rosmarínico. Los glicósidos son capaces de liberar compuestos volátiles por hidrólisis ácida o enzimática, por lo que pueden considerarse como precursores de sustancias antioxidantes en las plantas. Los extractos alcohólicos y étereos del clavo, la salvia, el orégano, el romero y el tomillo mostraron actividad antioxidante en todos los tipos de grasa que se han evaluado (49,50). En el orégano, los compuestos activos, son derivados fenólicos de los ácidos cafeico y romérico (51). A partir de las hojas secas de orégano (*O. vulgare* L.) se ha identificado como principal antioxidante un glicósido fenólico

(52). La timoquinona se ha encontrado como la aglicona mayoritaria en *O. vulgare ssp. Hirtum*. Las agliconas y el aceite esencial presentaron una actividad antioxidante equivalente e inhibieron la formación del hidróperóxido aún después de 80 días. Por su parte, el timol puro y la timoquinona tienen una actividad considerablemente menor, alcanzando un valor de peróxido de 250 mM/kg en tan sólo 30 y 22 días, respectivamente (15). El carvacrol, también contribuye a la actividad antioxidante (15,53,54).

En infusiones de *L. citriodora*, se ha encontrado actividad para atrapar radicales hidroxilo y ácido hipocloroso, aunque también se ha observado un efecto prooxidante en concentraciones arriba de $4 \mu\text{g/ml}$. Estas infusiones se caracterizan por la presencia de verbascosido, un compuesto fenil-etanoide ampliamente estudiado en cuanto a su actividad antioxidante, cuyo efecto protector se atribuye al residuo cafeoil o a la porción feniletilo (55).

Potencial antimicrobiano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (56,22). Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomonas aeruginosa* (23). Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (23, 56). Otros compuestos, como el γ -terpineno y p -cimeno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas (22, 23). Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/ml para hongos (22).

En el caso de *E. coli* O157:H7 existe una relación concentración/efecto a $625 \mu\text{L}$ con actividad bactericida después de 1 minuto de exposición al aceite, mientras que después de 5 minutos se requirieron 156 y $312 \mu\text{L}$. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. Se ha informado que las células que crecen en concentraciones subletales de carvacrol, sintetizan dos fosfolípidos adicionales y omiten uno de los fosfolípidos originales (57, 58).

Se ha demostrado que para los aceites de *L. multiflora* y *L. chevalieri*, los valores de CMI y de la concentración mínima bactericida (CMB) son más bajos para inhibir los microorganismos gram negativos (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Shigella disenteria*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*) que para los gram positivos (*Staphylococcus camorum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*). *L. multiflora* presenta alta actividad antimicrobiana debido a su alto contenido de timol y sus derivados. *L. chevalieri* contiene un alto porcentaje de p-cimeno, el cual ejerce un efecto antagónico con el carvacrol y el timol, lo que explica su baja actividad antimicrobiana (59,60).

El extracto etanólico de una línea clonal de orégano inhibió la acción de *Listeria monocytogenes* en caldo y otros productos de carne (61). También se ha encontrado que el aceite esencial de orégano es muy valioso en la inhibición de *E. coli* O157:H7 (62). Otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogroup *sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus*, se han logrado inhibir gracias a la presencia de extractos de orégano (2% v/v) (63). Estos estudios tienen importantes implicaciones para la industria alimentaria.

Efecto antiparasítico

El aceite esencial de *L. multiflora* es considerado un agente efectivo contra la infestación por piojos (*Pediculus humanus corporis* y *Pediculus humanus capitis*) y por el artrópodo *Sarcoptes scabiei*; incluso en mayor grado que el bencil benzoato, la droga más comúnmente empleada contra estos parásitos. En esta especie de orégano, los componentes mayoritarios en su aceite son el cimeno (8%), limoneno (15%), linalol (34%), geraniol (20%) y timol (4%). Entre los compuestos monoterpénicos volátiles presentes comúnmente en aceites esenciales, es conocida la capacidad del terpineol y del α - y β -pineno para matar piojos, aunque estos compuestos sólo se encuentran en bajas cantidades en dicho aceite esencial (3%, 1% y 4% respectivamente) (64). El aceite esencial de *L. multiflora* posee actividad antimalaria en diluciones tan altas como 1/8000 y 1/12000 lo que representa una alternativa interesante contra esta enfermedad debido a su baja toxicidad (65). Los extractos de *L. berlandieri* poseen actividad anti-giardia elevada, con una mortalidad de los trofozoitos del 90%, mayor que la causada por timidazol (79%), la droga típica usada para el tratamiento de la giardiasis (66).

Acción estrogénica

Los flavonoides son un grupo de fitoquímicos que poseen actividad hormonal. La habilidad de proteger contra la osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, acciones atribuidas a estrógenos endógenos como el 17β -estradiol, ha fundamentado la acción estrogénica de los flavonoides. Por otro lado, algunos de ellos presentan actividad antiestrogénica pues han demostrado prevenir la formación de tumores de mama (67,68).

Se ha encontrado que algunos alimentos, hierbas y especias contienen una gran cantidad de sustancias con actividad estrogénica. Zava, et al. (69) demostraron que el orégano (*O. vulgare*) es una de las seis especias con más alta capacidad para ligar progesterona, junto con la verbena, la cúrcuma, el tomillo, el trébol rojo y la damiana. Además se cree que el orégano puede poseer una ligera actividad estrogénica in vivo cuando es consumido a través de los alimentos (69,70). Sin embargo, se requiere más investigación para determinar con exactitud si los componentes del orégano posee actividad estrogénica.

Actividad insecticida

Los aceites esenciales de plantas representan una alternativa para la protección de los cultivos contra plagas (71). Algunos aceites esenciales y sus componentes poseen un amplio espectro de actividad contra insectos, ácaros, hongos y nemátodos, tales como *Rhizopertha dominica*, *Tribolium castaneum*, y *Sitophilus oryzae*, plagas que atacan granos almacenados y contra *Musca domestica* (71,72).

El aceite esencial de *O. syriacum* contiene un alto nivel de carvacrol (61%), el cual posee una concentración letal media (LC_{50}) = 37.6 mg/L, seguido del timol (21.8%) con un LC_{50} = 36 mg/L contra larvas del mosquito *Culex pipiens molestus*. Entre otros compuestos activos se tiene a la mentona, el 1,8-cineol, el linalol y el terpineol (73). Los aceites esenciales de *O. majorana* y *O. compactum* poseen una alta actividad insecticida contra huevos y adultos de *Mayetiola destructor* (74).

Capacidad antigenotóxica

La dieta es una fuente potencial de sustancias carcinogénicas a las que se exponen los humanos. Esto ha provocado un gran interés en buscar fuentes de nutrientes y de no-nutrientes que ayuden a prevenir o contrarrestar el efecto adverso que pudiesen ocasionar los aditivos sintéticos, tóxicos naturales, las sustancias generadas durante el procesamiento y los contaminantes accidentales. Se ha encontrado que algunos monoterpénos presentes en los aceites esenciales son inhibidores efectivos de la carcinogénesis. El aceite esencial de orégano tiene la capacidad de inducir un incremento en la actividad de la enzima destoxicante

glutathion S-transferasa (GST) cuando se administra oralmente, lo cual sugiere un potencial anticarcinogénico (75). Los monoterpenos con diferentes grupos funcionales tales como hidrocarburos, aldehídos y cetonas son inhibidores *in vitro* de las monooxigenasas CYP2B1, por lo que pueden alterar la biotransformación de sustancias tóxicas (76). Algunos modelos animales para cáncer han demostrado que varios monoterpenos poseen propiedades anticarcinogénicas actuando a diferentes niveles moleculares y celulares (77). Por ejemplo el carvacrol (50 y 100 μ M) reduce en 25% y 35%, respectivamente, el número de células de melanoma murino (B16F10), línea celular con un potencial metastásico elevado (78). Los extractos acuosos de *O. vulgare* y *O. majorama* presentaron importantes efectos antimutagénicos (79,80). La galangina y la quercetina, obtenidas de extractos metanólicos de hojas de orégano (*O. vulgare*), son flavonoides con actividad antimutagénica contra sustancias encontradas comúnmente en los alimentos (81). Por ejemplo, en nuestro laboratorio hemos encontrado un efecto protector del aceite esencial de orégano mexicano (*L. graveolens*) en la cepa TA98 de *S. thymurium*, contra 1-nitropireno, con una reducción de la mutagenicidad del 46% a una dilución de 1.25×10^{-5} (82). La cantidad de galangina y quercetina requerida para inhibir el 50% de la mutagenicidad de 20 ng del carcinógeno Trp-P-2 fue de 0.12 y de 0.81 μ g, respectivamente, mientras que los extractos de hexano, cloruro de metilo y acetato de etilo de orégano presentaron la mayor actividad inhibitoria (68%-72%) (81).

El tectol y la lipidoquinona presentes en *L. sidoides* mostraron inhibición *in vitro* contra células humanas de leucemia promielocítica (HL60) y leucemia linfoblástica aguda (CEM) (83). En *L. dulcis*, (+)-animol inhibe células de melanoma murino (B16F10). También las células HeLa fueron muy sensibles a los flavonas como la eupafolina (84). Se sabe que los patrones de sustitución en los anillos A y B tienen diferente influencia en la actividad contra diferentes células tumorales. El aceite de *O. vulgare* (dilución hasta 1:10000) presentó altos niveles de citotoxicidad contra células HeLa y de cáncer ovárico humano (85,86). También *O. majorama* presenta actividad antitumoral y citotóxica contra líneas tumorales (87-89).

Por otro lado, varios estudios clínicos han demostrado que *Oregano spp* presenta alergenicidad, por lo que se debe evitar el consumo excesivo de *O. vulgare* y *O. majorama* durante el embarazo además de sus propiedades abortivas (90).

Usos y aplicaciones industriales

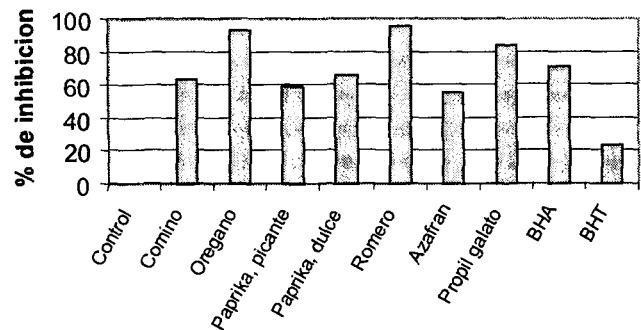
El orégano (*O. vulgare*) tiene usos medicinales, culinarios y cosméticos. Es utilizado en forma fresca y seca en la cocina mediterránea y de América Latina. Las especies de *Lippia* tiene usos tradicionales y farmacológicos tales como

culinarios, analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, sedantes, antidiarréico, tratamiento de infecciones cutáneas, antifúngico, tratamiento de desórdenes hepáticos, diurético, antihipertensivo, remedio de desórdenes menstruales, antimicrobiano, repelente, antimalaria, antiespasmódico, tratamiento de enfermedades respiratorias, de sífilis y gonorrea, contra la diabetes, abortivo y anestésico local (13,91).

Debido a la capacidad antioxidante de los extractos acuosos del orégano, se sugiere que éstos pueden ser empleados como sustituto de los antioxidantes sintéticos (42). La peroxidación lipídica es uno de los principales problemas en la industria de los cárnicos, durante el procesamiento, la preparación y el almacenamiento (Figura 5). En un intento por disminuir este problema se ha probado el efecto antioxidante de hojas, flores, extractos y aceite esencial de orégano con resultados positivos. Otra forma interesante de evitar la peroxidación de los ácidos grasos en la carne es utilizando los aceites esenciales del orégano como suplemento en la alimentación de los animales destinados para consumo humano.

FIGURA 5

Inhibición de la peroxidación lipídica de algunas especies y aditivos comunes (Adaptado de 103)



En el caso de aves como el pavo y el pollo cuya alimentación es enriquecida con aceite esencial de orégano se observa una reducción significativa de la oxidación lipídica en la carne cruda y cocinada mantenida en refrigeración, lo cual representa una buena alternativa al uso del α -tocoferol. Lo anterior es una evidencia de que los compuestos antioxidantes presentes en orégano, son absorbidos y entran al sistema circulatorio después de ser ingeridos (92-96). Sus propiedades antimicrobianas acentúan su uso potencial en diferentes formulaciones de alimentos, sobre todo en aquellas susceptibles a ser colonizadas por bacterias como *Salmonella spp*, *E. coli*, *Bacillus*, entre otras. Se ha observado que en carne almacenada en empaques al vacío y en atmósferas modificadas, la adición del aceite esencial de orégano es un medio efectivo para controlar el deterioro del producto aumentando con esto la inocuidad de su consumo (97, 98).

CONCLUSIONES

El creciente interés por el uso de extractos naturales como alternativa para la prevención y tratamiento de enfermedades ha revelado un importante potencial del orégano. Se ha demostrado que el orégano contiene sustancias antioxidantes, por lo que no sólo es benéfico para la salud humana, sino que además puede sustituir los aditivos sintéticos de los alimentos. Los aceites esenciales del orégano son también inhibidores de la mutagenicidad, propiedad que ha despertado el interés por este tipo de hierbas, como posible tratamiento contra el cáncer. Por otro lado, el extracto de orégano puede funcionar como antibactericida e insecticida, siendo igual o incluso más efectivo que los compuestos típicamente utilizados para estos propósitos. Los resultados de los experimentos con orégano confirman el potencial de esta planta y motivan su mejor aprovechamiento. Es de gran importancia explorar más los beneficios del orégano y entender más a fondo los procesos que le dan a esta especie sus propiedades biológicas tan diversas y atractivas.

AGRADECIMIENTOS

Esta publicación fue posible gracias al financiamiento de la Agencia para el Desarrollo Internacional (US-AID) proporcionado a través de la Oficina de la Asociación de Enlace para la Cooperación Universitaria para el Desarrollo (Association Liaison Office for University Cooperation in Development). Programa TIES-ENLACES, University of Illinois y Universidad Autónoma de Querétaro, México.

REFERENCIAS

- Pierce A. Practical guide to natural medicines. The American Pharmaceutical Association. A Stonesong Press Book. William Morrow and Company, Inc. New York. 1999; p 728.
- Nakatani N. Natural antioxidants from spices. In: Ho, C., Lee, C. Y., and Huang, M. Phenolic compounds in food and their effects on health II. American Chemical Society. 1992; Chap. 6: 72-85.
- Skuola M, Gotsiou P, Naxakis G, Johnson CB. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochem.* 1999; 52: 649-657.
- Lawrence BM. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfum. Flavorist.* 1984; 9 (5): 41-44, 49-51.
- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. I. Inflorescences. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 3741-3746.
- Kokkini S, Karousou R, Dardioti A, Krigas N, Lanaras T. Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochem.* 1997; 44 (5): 883-886.
- Martínez-Salvador M. Caracterización y evaluación del potencial productivo de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) en el municipio de Mapimi, Durango. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Mex. (México). Departamento de Zonas Áridas. Chapingo, México (México). 1997. 62 p. + mapa. (Tesis).
- Martínez-Domínguez M. Guía para el aprovechamiento del orégano *Lippia berlandieri* Schauer, en la zona norte de Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México. Campo Experimental Forestal Los Colomos. CIR Pacífico Centro. 1993. 11 p. Folleto para productores. Campo. Campo experimental los Colomos México. No. 1 INIFAP. C.E. Forestal Los Colomos. Apdo. Postal 6-163. Guadalajara, Jal. 44600. (México).
- Alarcón-Bustamante M. Método práctico para la predicción del rendimiento de hoja seca de orégano (*Lippia graveolens* HBK). Cd. Madera, Chih. (México). Campo Experimental Madera. CIR Norte Centro. Sep 1993. 11 p. Folleto Técnico. Campo Experimental Madera, México. No.1 INIFAP. C.E. Madera. Aldama s/n, Cd. Madera,
- Martínez-Domínguez M. Detección y evaluación de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) en las zonas del norte de Jalisco y suroeste de Zacatecas. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo (México). División de Ciencias Forestales. 1990. 145 p. (Tesis)
- Martínez-Domínguez M. Innovación tecnológica para eficientar el rendimiento en cosecha de orégano *Lippia berlandieri* Shauer. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (México). Centro Regional de Investigación Forestal y Agropecuaria del Pacífico Centro. Estado de Jalisco. Reunion Científica Forestal y Agropecuaria del Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Resúmenes. Guadalajara, Jalisco (México). 1991. No. 5 p. 104.
- Dewick PM. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & sons. 1997; Chap. 5: 152-213.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76, 201-214.
- Justesen U, Knuthsen P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry.* 2001; 73, 245-250.
- Milos M, Mastelic J, Jerkovic I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp. hirtum*). *Food Chem.* 2000; 71, 79-83.
- Gerothanassis IP, Exarchou V, Lagouri V, Troganis A, Tsimidou M, Boskou D. Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to methanolic extracts of two Oregano species. *J Agric Food Chem.* 1998; 46, 4185-4192.
- Rastrelli L, Caceres A, Morales C, De Simone F, Aquino R. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochem.* 1998; 49 (6), 1829-1832.
- Wagner KH, Elmadfa I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann. Nutr. Metabol.* 2003; 47 (3-4): 95-106.

19. Hutchings A, van Staden J. Plants for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: Plants used for headaches. *J. Ethnopharmacol.* 1994; 43(2): 89-124.
20. Robbers J E, Speedie M K, Tyler VE. *Pharmacog. Pharmabiotech.* 1996; Chap. 6: 80-107.
21. D'antuono LF, Galletti GC, Bocchini P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a north mediterranean area (Liguria region, north Italy). *Ann Bot.* 2000; 86: 471-478.
22. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 4168-4170.
23. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 1202-1205.
24. Pino JA, Boroës P, Fuentes V, Martínez MA, Rosado A. Production of oregano in Cuba: An alternative to importation. *Alimentaria* 1997; 35 (280): 69-71.
25. Economakis C, Skaltsa H, Demetzos C, Sokovic M, Thanos CA. Effect of phosphorus concentration of nutrient solution on the volatile constituents of leaves and bracts of *Origanum dictamnus*. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6276-6280.
26. Wilkins MB. The physiology of plant and development, McGraw-Hill. 1998-University of California-Small Farm Center. Culture Information for Oregano.
27. Lecona-Urbe S, Loarca-Piña F G, Arcila-Lozano C, Díaz-Moscoso C, Ocampo R. Nutraceutical potential of Mexican oregano (*Lippia graveolens* K). IFT Annual Meeting, 2003; 14E-28.
28. De Mastro, G. Crop domestication and variability within accessions of *Origanum* genus. In: Padulosi., S., editor. Oregano. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996. CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy. 1997; p. 34-48.
29. Chlodwig F, Novak J. Breeding of *Origanum* species. In: Padulosi., S., editor. Oregano. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996. CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy. 1997; p. 49-56.
30. Marzi, V. Agricultural practices for oregano. In: Padulosi., S., editor. 1997 Oregano. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 14. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996. CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy. 1997; p. 61-67.
31. Putievsky E, Dudai N, Ravid U. Cultivation, selection and conservation of oregano species in Israel. In: Padulosi, S., editor. Oregano. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 14. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996. CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy. 1997; p. 102-109.
32. Thomann RJ, Ehrich J, Bauermann U. Distillation and use of essential oils from dill, celery, lovage and parsley made in Germany. *Acta Hort.* 1993; 333:101-111.
33. Simándi B, Oszagyan M, Lemberkovic É, Kéry Á, Kaszács J, Thyron F, Mátyás T. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Res. Int.* 1998; 31 (10): 723-728.
34. McGimpsey, J. Oregano. *Origanum vulgare*. Crop & Food research. 1993. <http://www.crop.cri.nz/psp/broadshe/oregano.htm>
35. Uribe-Hernández CJ. The essential oil of *Lippia graveolens* H.B. K. from Jalisco México. *J Essential Oil Res.* 1992; 4 (6): 647-649.
36. Vernin G, Lageot C, Gaydou E, Parkanyi C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. *Flavour Fragrance J.* 2001; 16 (3): 219-226.
37. Baricevik D, Bartol T. In: Oregano. The genera *Origanum* and *Lippia*. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Edited by Spiridon E. Kintzios, Athens, Greece. Taylor and Francis. London and New York. 2002. Chap.8. p 177-213.
38. Kahkoren MP, Hopia AI, Vucrela HJ, Rauha J-P, Pihlaja, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 3954-3962.
39. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers, *J Sci Food Agric.* 1999; 79: 2010-2016.
40. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992; 32: 67-103.
41. Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *Am Soc Nutr Sci.* 2003; 133(5): 1286-1290.
42. Martínez-Tomé M, Jiménez AM, Ruggieri S, Frega N, Strabbioli R, Murcia MA. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *J Food Protect.* 2001; 64 (9): 1412-1419.
43. Moure A, Cruz J M, Franco D, Domínguez J M, Sineiro J, Domínguez H, Núñez M J and Parajó J C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001; 72(2): 145-171.
44. Deighton N, Gridewell S M, Deans S J, Goodman B A. Identification by EPR spectroscopy of Carvacrol and Thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *J Sci Food Agric.* 1993; 63: 221-225.
45. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SJ, Biondi DM, Ruberto G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J Essent Oil Res.* 1998; 10(6): 618-627.
46. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragrance J.* 1998; 13: 235-244

47. Madsen HL, Rud Nielsen B, Bertelsen G, Skibsted LH. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chem.* 1996; 57 (2): 331-337.
48. Calucci L, Pinzino C, Zandomenighi M, Capocchi A, Ghiringhelli S, Saviozzi F, Tozzi S, Galleschi L. Effects of γ -irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 927-934.
49. hahidi F, Nacz M. Antioxidant properties of food phenolics. In: *Food phenolics. Sources, chemistry, effects, applications.* Technomic. Pub. Co., Inc., 1995; 8:267.
50. Madhavi DL, Singhal RS, Kulkarni PR. Technological aspects of food antioxidants. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D.K. (eds). *Food Antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives.* Marcel Dekker, Inc. 1996; 4:159-265
51. Rajalakshmi D, Narasimhan S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D.K. (eds). *Food Antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives.* Marcel Dekker, Inc. 1996; 3:65-157
52. Nakatani N, Kikuzaki H. A new antioxidative glycoside isolates from oregano. *Agric. Biol. Chem.* 1987; 51:2727.
53. Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis IP, Troganis A, Boskou D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 5294-5299.
54. Vichi S, Zitterl-Eglseer K, Jugl M, Franz Ch. Determination of the presence of antioxidants deriving from sage and oregano extracts added to animal fat means of assessment of the radical scavenging capacity by photochemiluminescence análisis. *Nahrung/Food.* 2001; 45 (2): 101-104.
55. Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos M de L. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hidroxy radical and hypochlorous acid. *Biol. Pharm. Bull.* 2002; 25(10): 1324-1327.
56. Elgayy M, Draughon F., Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J Food Protect.* 2001; 64 (7): 1019-1024.
57. Burt SA, Reinders RD, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Applied Microbiol.* 2003; 36: 162-167.
58. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol.* 2000; 174: 233-238.
59. Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore SA. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochem.* 2003; 62(2): 209-212.
60. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palma, F. In-vitro antimicrobial activity and composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 29: 130-135.
61. Saeberg AC, Labbe RG, Shetty K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by elite clonal extracts of oregano (*Origanum vulgare*). *Food Biotechnol.* 2003; 17 (2): 129-149.
62. Sagdic O, Kuscü A, Ozcan M, Ozcelik S. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 2002; 19 (5): 473-480.
63. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol.* 1999; 86 (6): 985-990.
64. Oladimeji FA, Orafidiya OO, Ogunniyi TAB, Adewunmi TA. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72: 305-311.
65. Valentin A, Pélissier Y, Benoit F, Marion C, Kone D, Mallie M, Bastide J-M, Bessière J-M. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytochem.* 1995; 40 (5): 1439-1442.
66. Ponce-Macotela M, Navarro-Alegria I, Martinez-Gordillo MN, Alvarez-Chacon R. In vitro effect against *Giardia* of 14 plant extracts. *Rev Invest Clin.* 1994; 46(5): 343-347.
67. Frigo DE, Duong BN, Melnik LI, Schief LS, Collins-Burow BM, Pace DK, McLachlan JA, Burow ME. Flavonoid phytochemicals regulate activator protein-1 signal transduction pathways in endometrial and kidney stable cell lines. *Am Soc Nutr Sci.* 2002; 132(7): 1848-1853.
68. Mauvais-Jarvis P, Kuttent F, Gompel A. Estradiol/progesterone interaction in normal and pathologic breast cells. *Annals New York Academy Sci*, 1986; 464: 152-167.
69. Zava DT, Dollbaum CM, Blen M. Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs and spices. *Soc Exp Biol Med.* 1998; 217(3): 369-378.
70. Howes M-JR, Houghton PJ, Barlow DJ, Pocock VJ, Milligan SR, Assessment of estrogenic activity in some common essential oil constituents. *J. Pharmacy Pharmacol.* 2002; 54: 1521-1528.
71. Isman M. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection.* 2000; 19: 603-608.
72. Prates HT, Santos JP, Waquil JM, Fabris JD, Oliveira AB, Foster JE. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbs). *J. Stored Prod. Res.* 1998; 34 (4): 243-249.
73. Traboulsi AF, Taoubi K, El-Haj S, Bessiere JM, Rammal S, Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Sci.* 2002; 58: 491-495.
74. Lamiri A, Lhaloui S, Benjlali B, Berrada M. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.* 2001; 71: 9-15.
75. Lam LKT, Zheng B. Effects of essential oils on Glutathione S-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.* 1991; 39, 660-662.
76. De-Oliveira ACAX, Ribeiro-Pinto LF, Paumgarten FJR. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compound. *Tox Lett.* 1999; 92: 39-46.
77. Loza-Tavera H. Monoterpenes in essential Oils. Biosíntesis and properties. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 464: 49-62.

78. He L, Mo H, Hadisusilo S, Quresh, AA, Elson CE. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *Am Soc Nutr Sci.* 1997; 127(5): 668-673.
79. Ueda S, Kuwabara Y, Hirai N, Sasaki H, Sugahara T. Antimutagenic capacities of different kinds of vegetables and mushrooms. *J Japn Soc Food Sci. Technol.* 1991; 38 (6): 507-514.
80. Nakate M, Kanazawa K, Mizuno M, Ueno N, Kobayashi T, Danno G, Minamoto S. Herb-water extracts markedly suppress the mutagenicity of Try-P-2. *Agric Biol Chem.* 1989; 53 (5): 1423-1425.
81. Kanazawa K, Kawasaki H, Samejima K, Ashida H, Danno G. Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against a dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin. *J Agric Food Chem.* 1995; 43: 404-409.
82. Arcila C, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, González de Mejía E. Biological activity and composition of essential oil from Mexican oregano. Botanical and Dietary Supplements for Woman's Health: Frontiers in Research. Functional Foods for Health Program 12th Annual Conference, July 9-11 2003; Schaumburg, IL.
83. Costa SMO, Lemos TLG, Pessoa OD., Pessoa C, Montenegro RC, Braz-Filho R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. *J Nat Prod.* 2001; 64: 792-795.
84. Abe F, Nagao T, Okabe H. Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(7): 920-922.
85. Sivropoulos A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J Agric Food Chem.* 1996; 44 (5): 1202-1205.
86. He L, Mo H, Hadisusilo S, Qureshi AA, Elson CE. Isoprenoids suppress the growth of Murine B16 melanoma in vitro and in vivo. Biochemical and molecular roles of nutrients. *Am Soc Nutr Sci.* 1997; 127(5): 668-674.
87. Assaf MH, Ali AA, Makhoul MA, Beck JP, Anton R. Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum* majorama, quantitative estimation of arbutin cytotoxicity activity of hydroquinone. *Planta-Medica* 1987; 53 (4): 343-345.
88. Okuyama T, Matsuda M, Masuda Y, Baba M, Masubuchi H, Adachi M, Okada Y, Hashimoto T, Zou LB, Nishino H. Studies on cancer bio-chemoprevention of natural resources. X. Inhibitory effect of species on TPA-enhanced 3H-choline incorporation in phospholipids of C3H 10T 1/2 cells and TPA-induced mouse ear edema. *Clin Pharm J.* 1995; 47 (5): 421-430.
89. Hirobe C, Qiao ZS, Takeya K, Ibokawa H. Cytotoxic principles from Majorama Syriaca. *Nat. Med.* 1998; 52 (1): 74-77.
90. Brinker F. Herb contraindications and drug interactions. *Eclectic Medical Publ.* Sandy, Oregon 1998; 263 pp.
91. Tárrega I, Rivas F. Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum bastetanum*. *Phytochem.* 1998; 48 (8): 1347-1349.
92. Botsoglou NA, Grigoropoulou SH, Botsoglou E, Govaris A, Papageorgiou G. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Sci.* 2003; 63(3): 1193-1200.
93. Botsoglou NA, Govaris A, Botsoglou EN, Grigoropoulou SH, Papageorgiou G. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(10): 2930-2936.
94. Abdalá AE, Roozen JP. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. *Eur. Food Res Technol.* 2001; 212: 551-560.
95. Botsoglou NA, Christaki E, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Spais AB. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Sci.* 2002; 62: 259-265.
96. Botsoglou NA, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Christaki E, Spais AB. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meta by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. *Food Res Int.* 2003; 36: 207-213.
97. Skandamis P, Tsigarida E, Nychas G-JE. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5° C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiol.* 2002; 19: 97-103.
98. Yousif AN, Durance TD, Scaman CH, Girard B. Headspace volatiles and physical characteristics of vacuum-microwave, air, and freeze-dried oregano (*Lippia berlandieri* Schauer). *J Food Sci.* 2000; 65 (6): 926-930.
99. Ruberto G, Baratta MT, Sari M, Kaâbeche M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* desf. *Flavour Fragrance J.* 2002; 17: 251-254.
100. Alaniz-Gutierrez L. Contribución al estudio de la calidad de aceite esencial en oregano *Lippia graveolens* H.B.K. Universidad Autonoma Chapingo. Chapingo, Mex. (México). Departamento de Zonas Aridas. Chapingo, Mexico (México). 1998. 46 p. Tesis (Ingeniero Agrónomo en Sistemas Agrícolas de Zonas Aridas).
101. Takácsová M, Príbela A, Faktorová. Study of the antioxidative effects of thyme, sage, juniper and oregano. *Die Nahrung.* 1995; 39: 241-243.
102. Dorman HJD, Surai P, Deans SG. In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *J. Essent. Oil Res.* 2000; 12 (2): 241-248.
103. Avila-Sosa R, Avila-Camacho A, Torres-Muñoz JV, Gastélum-Franco MG, Nevárez-Moorillón GV. Antioxidant and antimicrobial capacity of Mexican Orégano. IFT Annual Meeting, 2002; 46C-32.

Recibido:22-08-2003

Aceptado: 10-12-2003

Effects of different thermal treatments and storage on the proximate composition and protein quality in canned tuna

García-Arias M.T, Navarro M.P., García-Linares M.C.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León, Spain - Instituto de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, Madrid, Spain

SUMMARY. The purpose of this project was to study the modifications in nutrient composition, amino acid content, and protein quality of white tuna preserves after each of the thermal treatments involved in the canning process. Also the influence that a three years storage period at room temperature has on the nutritional quality of canned tuna was studied. The biological assays used for the study of the protein utilization were carried out on Wistar rats, fed on semi-synthetic diets for 12 days varying only the protein source, casein or tuna provided as follows: raw, cooked in brine, steamed, sterilized tuna, and canned tuna stored for three years. The sterilization process and storage time led to a great increase in the lipid content of the canned tuna and to a porcentual decrease in protein, and moisture content. Amino acid composition of canned and cooked tuna did not show great modifications compared to raw tuna. Neither protein digestibility nor biological value of the cooked, canned, and stored tuna showed any deterioration. The protein quality of white tuna meat preserves has been compared with preserves made up of red and white tuna meat.

Key words: Canned tuna, protein quality, storage time, cooking, sterilization, amino acid, nutrient content.

RESUMEN. Efecto de diferentes tratamientos térmicos y del almacenamiento sobre el contenido en macronutrientes y la calidad proteica de atún en conserva El objetivo de este trabajo fue estudiar las modificaciones en el contenido en nutrientes, aminoácidos y la calidad proteínica de conservas de atún blanco después de cada uno de los tratamientos térmicos incluidos en el proceso de enlatado. Así como estudiar la influencia que el almacenamiento durante tres años a temperatura ambiente ejerce sobre la calidad nutricional del atún en lata. Los ensayos biológicos empleados para estudiar la utilización proteínica se llevaron a cabo con ratas Wistar, alimentadas con dietas semisintéticas durante 12 días variando solamente la fuente proteínica, caseína o atún, proporcionado de la siguiente manera: crudo, cocinado en salmuera, cocinado al vapor, esterilizado y enlatado almacenado durante tres años. El proceso de esterilización y el tiempo de almacenamiento producen un incremento en el contenido de lípidos del atún enlatado y un descenso porcentual en el contenido de proteína y humedad. El perfil aminoacídico del atún enlatado y cocinado no mostró grandes modificaciones comparado con el atún crudo. Ni la digestibilidad proteínica ni el valor biológico del atún cocinado, enlatado y almacenado mostró ninguna alteración. La calidad proteínica de las conservas de carne blanca de atún fue comparada con la calidad proteínica de las conservas elaboradas con carne roja y blanca de atún.

Palabras clave: Atún enlatado, calidad proteínica, tiempo de almacenado, cocinado, esterilización, aminoácidos, contenido en nutrientes.

INTRODUCTION

White tuna, *Thunnus alalunga*, represents a very interesting species of fish from both the nutritional and economic points of view. This is primarily because of the high prices it reaches on the market. Most of the tuna caught is destined for the production of preserves, therefore it is important to study the different stages of the canning process with the objective of optimizing the nutritional quality of the final product.

There are two edible parts in white tuna fish: white and red meat, which each present different nutrient composition (1, 2). Muscle has a very low fat content compared with the

high proportion of fat contained in the belly flap. So, depending on the part of the tuna that is canned, the reactions produced in the fish to preparation and storing may vary, modifying hereby the nutritional value of the final product. This is important because each manufacturer cans different parts of the tuna fish, according to consumer preference and/or economic factors (3).

Fish protein damage can be produced during thermal processes, cooking and sterilization, by reactions between amino acids and oxidation products of the fish lipids, which are produced during the processes mentioned above (4-6). These interactions could continue during storage of the canned product which has not lost the capacity of reaction.

So, since canned foods are stored during variable time periods before their consumption, it would be interesting to know if nutritional deterioration occurs, and if so, when this begins, in order to establish an expiration date for canned tuna. Therefore, the purpose of this project was to study:

a) The modifications in: nutrient composition, amino acid content and nutritional quality of protein of white tuna meat after each of the thermal processes involved in preparing canned tuna-steaming or cooking in brine and sterilization.

b) The influence that a three year storage period at room temperature has on the nutritional quality of canned tuna.

These results were compared with those obtained by García-Arias et al (7) in preserves of the same tuna species in which both white and red meat were canned.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Twelve tuna *Thunnus alalunga* weighing between 4.6 and 5.0 kg were caught by a commercial tuna vessel near the point 43°N and 27°W during June 1998. The tuna was kept in boxes and transported on ice over 10 days. After arrival, the fish were frozen at -40°C and stored at -18°C for 4 months. The different stages of sample preparation describes as follows took place in the pilot plant of the Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC).

Processing

The twelve whole thawed tuna were, beheaded, eviscerated, washed, and randomly divided into two groups. Both groups were cooked until a final backbone temperature of 65°C. One of them was cooked in brine (130 g salt/l water) and the other one was steamed (102-103°C). Afterwards, tuna was cooled at 14°C for about 5 hours and skin, bones, backbone and red meat were removed from every cooked fish. Approximately 3 kg of each product were set aside and used as samples, that represents 3 kg of steamed sample (S) and 3 kg of cooked in brine sample (B).

The rest of the fish, approximately 20 kg of white meat of each kind of cooked tuna, was canned. In the case of steamed tuna, 80 g of white meat together with 35 ml of soybean oil and 1.6 g of sea salt were put into each can (OL-120 shape), obtaining an amount of 250 cans, and in the case of cooked in brine tuna, 80 g of white meat mixed with 35 ml of soybean oil were put into each can, obtaining an equal number of cans. Both kinds of cans were closed and sterilized at 115°C for 90 min. The cans were left to "age" for 30 days, for the cover oil and salt to be distributed equally and absorbed by the solid content. After this period of time, a mixture of the content of 12 cans of each modality was made (samples SCO and BCO). The rest of the tins were stored for three years at room temperature (approximately 20°C). After this

period of time, a mixture of the content of 12 cans of each kind was also made (samples SC3 and BC3).

Finally an amount of 5 kg of raw white tuna meat in pieces were chosen at random from different fishes and different parts of their bodies and were used as a reference sample (R).

Each one of the samples was correspondingly lyophilized and later stored at -20°C until they were analyzed and used as a protein source in the animal assays.

Keys:

R: Raw tuna; **S:** Steamed tuna; **B:** Tuna Cooked in Brine; **SCO:** Steamed Canned Tuna; **BCO:** Tuna Cooked in Brine and Canned; **SC3:** Canned Steamed tuna stored for 3 years; **BC3:** Tuna cooked in Brine and Canned, stored for 3 years.

Analytical techniques

Proximate analysis

Homogeneous mixtures of 3-5 g were dried at 100°C to constant weight by standard methods (8) for moisture determination. Total protein was calculated from Kjeldahl procedure using a 6.25 conversion factor. Total lipid was extracted from lyophilized samples with petroleum ether 40-60° in an extracting Unit Soxtec System 1040 Tecator. Ether extract was gravimetrically evaluated. Samples for ash were dried according to methods outlined in AOAC (8) using a muffle furnace at 550°C to constant weight.

Amino acid analysis

Amino acids were analysed after hydrolysis (6M HCl) by ion-exchange chromatography (Chromakon 500) using nor-valine as an internal standard (9). Since methionine and cysteine are partially broken down by acid hydrolysis, they were oxidized to cysteic acid and methionine sulphone prior to hydrolysis (10).

Apparent digestibility and protein quality

100 Wistar weanling rats weighing 40±0.5 g were used for balance assays. Each group of 10 rats (5 male and 5 female) was placed in individual metabolism cages in an environmentally controlled room maintained at 20-22°C, with a 12h light-12h dark cycle and 55-70% humidity.

Isocaloric and semi-synthetic diets, according to the recommendations of the National Research Council (11), were prepared with the following theoretical content: 39.5% starch (Central Ibérica de Drogas, S.A. Madrid), 39.5% sugar (Confisa, S.A. Madrid), 7.5% fat (soybean oil), 5% non-nutritive fiber (Central Ibérica de Drogas, S.A. Madrid), 3.34% mineral mixture (E. Merck Darmstadt) and 0.12% vitamin mixture (Roche).

It must be taken into account that when raw and processed

tuna were used as a protein source, fat was supplied simultaneously into the diet. Thus, in our study, that amount of fat supplied by tuna was reduced from the oil added to the diet. The diets composition are shown in Table 1.

TABLE 1
Macronutrient composition in diets of rat assays (g/ 100g)

Protein Source*	Moisture	Protein	Lipid	Ash
Casein + DL Methionine	6.41±0.03	9.7±0.1	8.0±0.1	2.8±0.1
R	5.72±0.03	10.0±0.1	7.8±0.1	3.4±0.1
S	5.63±0.05	10.0±0.1	7.8±0.2	3.2±0.1
B	5.81±0.06	10.0±0.1	7.7±0.2	3.3±0.1
Casein + DL Methionine	7.00±0.06	10.1±0.1	7.3±0.3	3.6±0.1
SCO	6.91±0.08	10.1±0.1	8.5±0.1	3.6±0.1
BCO	7.00±0.09	9.6±0.1	8.3±0.1	3.3±0.1
Casein + DL Methionine	5.99±0.06	10.4±0.1	8.1±0.2	3.0±0.2
SC3	5.19±0.02	10.0±0.1	7.5±0.3	2.9±0.1
BC3	4.85±0.01	10.3±0.1	8.5±0.2	2.9±0.2

Values are mean ± standard deviations for four samples

*For abbreviations, see Material and Methods.

The balances were conducted in three different stages using different balanced groups of rats.

* First stage, three groups were fed on diets with the protein (10%) provided from raw, steamed, and cooked in brine tuna. The fourth group was fed on diet in which casein + DL methionine (0.2% of the diet) provided the reference protein.

* Second stage, two groups of rats were fed on diets with the protein (10%) provided from SCO and BCO. Casein + DL methionine was again used as reference protein.

* Third stage, after three years storage, new nitrogen balances took place using the samples SC3 and BC3. Casein + DL methionine was again used as reference protein.

The assay involved a preliminary five day adaptation period during which solid intake and body weight changes were monitored, followed by a second period lasting seven days in which nitrogen balances were carried out. Animals were fed and allowed to drink "ad lib". In order to evaluate nitrogen balances, food intake was monitored during the last week of the trial and urine and faeces were collected in 1 week pools. Urine was collected on 0.5 M HCl, and later, filtered and diluted. Faeces were dried, weighed and homogenized. Diets, faeces, and urine were analysed for nitrogen content using the Kjeldahl procedure.

The following indices were calculated: absorbed nitrogen (NA)= ingested nitrogen (NI)-fecal N; retained nitrogen (NR)= NA- urinary nitrogen; digestibility (DC)= NA/NI * 100; biological value (BV)= NR/NA * 100 and net protein utilization (NPU)= NR/NI * 100.

The values were analyzed by the one-way analysis of variance (ANOVA). The Scheffe test to compare means was used when a significant variation was highlighted by ANOVA. The significance of the results was established at P<0.05 level.

RESULTS AND DISCUSSION

Nutrient composition

Macronutrients

Moisture, protein, fat, and ash contents in the edible part of the white meat of raw tuna (R) are within the range indicated for tunas (12). The value of protein is among the highest (27.33%) and the value of fat among the lowest (1.90%) (Table2).

TABLE 2
Moisture, protein, lipid and ash content for raw, cooked and canned white meat tuna

White meat Tuna‡	Moisture	Protein g/100 g edible portion	Lipid	Ash	Protein	Lipid g/100 g dry matter	Ash
R	70.0±0.2	27.3±0.5	1.9±0.2	1.5±0.1	91.4±1.8	6.4±0.8	5.0±0.1
S	64.0±0.1†	31.4±0.1†	4.7±0.1†	1.2±0.0†	87.6±0.4†	13.0±0.3†	3.4±0.0†
SCO	59.6±1.2†*	32.9±0.4†*	7.4±0.2†*	2.5±0.1†*	80.2±1.0†*	18.3±0.4†*	6.2±0.2†*
SC3	56.6±0.2†**	32.9±0.1†*	8.4±0.2†**	2.9±0.0†**	75.9±0.3†**	19.3±0.4†**	6.6±0.1†**
B	64.0±0.1†	33.0±0.2†*	3.3±0.1†*	1.4±0.0†*	91.7±0.6*	9.2±0.2†*	3.9±0.0†*
BCO	60.1±0.3†*	33.2±0.6†	7.2±0.1†*	1.3±0.1†*	83.4±1.6†**	18.0±0.3†*	3.3±0.2†**
BC3	55.7±1.5†**	33.6±0.1†**	9.4±0.1†**	1.8±0.1†**	76.0±0.2†**	21.3±1.9†**	4.2±0.1†**

Values are mean ± standard deviations for four samples.

‡ For abbreviations, see material and methods. †Significant differences (P<0.05), relative to R.

*Significant differences (P<0.05), relative to S or B respectively.

†Significant differences (P<0.05), relative to S, SCO or SC3 respectively.

**Significant differences (P<0.05), relative to SCO or BCO respectively

After steaming (S) or cooking in brine (B), moisture decreased by approximately 6%, as has been described in other fish like sardine (13), mussel (14), and other tuna species (15, 16). This decrease made the protein and fat contents increase when expressed as g/100 g edible portion, with a greater protein increase in B and a greater fat increase in S.

By expressing the values in dry matter, we shall see that there was actually a protein loss of 4% in steaming, which was not a result of being cooked in brine. This can be explained by the high saline concentration of brine. Due to this protein percentage stability, the percentage of fat in B was less than that corresponding to S (Table 2).

The quantity of ash descended after cooking raw tuna in both ways. In S, this decrease was less because of the incorporation of Na from the brine.

As is well known, sterilization involves an exchange of substances between food and coating liquid consisting in an interchange between the water of the fish and the coating oil (5,17). This effect seems clear in our experiment, as both contents, water and fat, resulted to be inversely correlated

($r = -0.9464$) ($P < 0.01$). This led to a great increase in the lipid content of the canned tuna and thus to a percentual decrease in protein content if the figures are expressed in dry matter.

In SCO, because of the addition of salt to the cans, the percentage of ash elevated.

When both preserves were stored for three years (BC3 and SC3), water was again lost and fat increased percentually compared to recently canned tuna (SCO and BCO). The percentage of protein expressed in dry matter decreased to reach, in both cases, the same quantity (75.90%) (Table 2).

Amino acids

The amino acid composition of the white tuna meat did not show great variation from other fish species. After cooking in either of the ways practiced, the amino acid profile did not vary much, although valine and tyrosine increased significantly in both samples (Table 3). Once the product is canned, these differences disappeared and only a significant increase in valine in SCO was noted (Table 3).

TABLE 3
Amino acid composition of raw, cooked and canned white meat tuna (g/16 g N)

Aminoacid	R	S	SCO	SC3	B	BCO	BC3
ASP	9.61±0.91	9.38±0.40	9.62±0.20	9.71±0.38	8.96±0.36	9.17±0.35	9.23±0.34
THR	4.57±0.61	4.20±0.22	4.22±0.15	4.20±0.22	3.83±0.24	4.10±0.18	4.10±0.26
SER	3.94±0.43	3.65±0.19	3.59±0.13	3.50±0.18	3.45±0.14	3.59±0.16	3.40±0.15
GLU	12.89±0.18	13.38±0.56	13.46±0.33	14.41±0.55	12.98±0.42	13.02±0.59	13.05±0.41
PRO	4.19±0.27	3.91±0.47	3.77±0.63	3.85±0.53	3.60±0.51	3.48±0.40	3.54±0.49
GLY	4.59±0.26	4.80±0.34	4.95±0.15	4.83±0.25	4.49±0.05	4.72±0.15	4.60±0.17
ALA	5.19±0.33	5.59±0.32	5.60±0.09	5.40±0.20	5.47±0.11	5.40±0.14	5.42±0.12
VAL	4.87±0.18	5.91±0.20†	6.12±0.08†	6.00±0.17	5.74±0.20†	5.85±0.27	5.80±0.23
ILE	4.54±0.26	5.28±0.23†	5.62±0.15	5.52±0.16	4.99±0.18	5.36±0.18	5.20±0.21
LEU	7.36±0.56	8.02±0.32	8.31±0.16	8.50±0.28	7.77±0.23	8.12±0.32	7.95±0.30
TYR	3.09±0.10	3.87±0.10†	4.04±0.14	4.01±0.12	3.91±0.10†	3.44±0.13	3.56±0.14
PHE	3.97±0.29	4.20±0.20	4.37±0.37†	4.25±0.23	4.04±0.13	4.20±0.21	4.11±0.24
LYS	8.32±0.51	8.85±0.79	8.81±0.36	8.81±0.49	8.87±0.77	9.00±0.36	8.75±0.56
HIS	5.71±0.40	5.41±0.42	5.07±0.25	5.12±0.39	5.28±0.61	5.30±0.22	5.20±0.33
ARG	6.27±0.36	7.17±0.41	5.85±0.17	5.90±0.21	5.53±0.24	5.54±0.36	5.34±0.29
MET	3.56±0.11	3.63±0.23	3.54±0.18	3.30±0.20	2.80±0.19	3.68±0.20	3.24±0.17
CYS	1.44±0.09	1.44±0.02	1.63±0.10	1.30±0.10	1.60±0.03	1.58±0.01	1.35±0.08

Values are mean ± standard deviations for four samples.

* For abbreviations, see material and methods. † Significant differences ($P < 0.05$), relative to R.

The results lead one to believe that, in our case, the time and temperature conditions used in processing were not drastic enough to produce great variation in any amino acid as described by Steiner et al (18) and Seet & Brown (19), but that, as occurs in mild thermal treatments, the amino acidic profile was maintained (20).

Protein Quality

The protein quality study showed that the quality of protein in white tuna meat is comparable to the casein DL methionine quality (Table 4).

TABLE 4
Digestive and metabolic utilization of protein of raw, cooked and canned white meat tuna

Source*	Ingested N	Faecal N mg/day	Urinary N	Protein Absorbed N	Retained N	Apparent DC	BV	NPU
Casein+DL								
methionine	146.1±4.9	12.3±0.5	25.9±1.6	133.7±4.8	107.8±5.1	91.4±0.4	80.3±1.4	73.5±1.3
R	143.7±6.7	12.0±0.5	30.5±4.8	131.6±6.5	101.0±7.5	91.5±0.4	76.6±3.6	70.1±3.3
S	147.3±3.9	14.8±0.7	21.6±2.6	132.5±3.9	110.8±4.6	89.9±0.5	83.5±2.0	75.0±1.9
B	147.4±7.6	13.6±0.7	28.9±2.9	133.7±7.6	104.7±6.7	90.4±0.8	78.2±2.0	70.7±1.7
Casein+DL								
methionine	158.4±5.4	15.6±1.3	26.3±1.1	142.7±4.6	116.3±4.6	90.2±0.6	81.2±1.1	73.3±1.1
SCO	137.2±5.7	13.9±1.7	18.3±1.4	123.2±5.2	104.9±4.9	89.8±0.9	85.0±1.0	76.4±1.2
BCO	126.9±4.8	13.4±0.7	16.2±1.4	113.5±4.4	97.2±4.2	89.4±0.4	85.6±1.2	76.5±1.2
Casein+DL								
methionine	157.9±5.2	13.7±1.5	12.9±0.9	145.4±6.6	132.7±7.4	91.2±1.2	91.0±1.2	83.1±1.9
SC3	148.0±3.9	16.4±0.5	12.5±3.2	130.9±4.5	118.4±4.0	88.8±0.5	90.5±0.8	80.4±0.9
BC3	153.4±5.3	17.3±1.8	13.6±1.8	138.2±5.1	124.5±4.6	88.9±1.1	90.2±1.3	80.2±1.5

DC: Digestibility Coefficient; BV: Biological Value; NPU: Net Protein Utilization

Values of ten animals each group expressed as mean ± SEM

* For abbreviations, see Material and Methods. No significant differences.

The cooking process with or without salt did not change the coefficients of apparent digestibility (ADC), apparent biological value (ABV), nor apparent net protein utilization (ANPU). This proves that since moderate heat treatments did not alter the amino acid content, they did not modify the nutritional value of the protein either, as noted by Finot (21).

After the sterilization of the canned tuna, the protein digestibility did not vary, nor did the biological value, so the net protein utilization of the canned tuna was high and very near that of the protein reference according to Varela et al (22); and Hellendorn et al (23).

When these tuna preserves were stored at room temperature for three years, the digestibility and biological value of their protein showed no deterioration (Table 4).

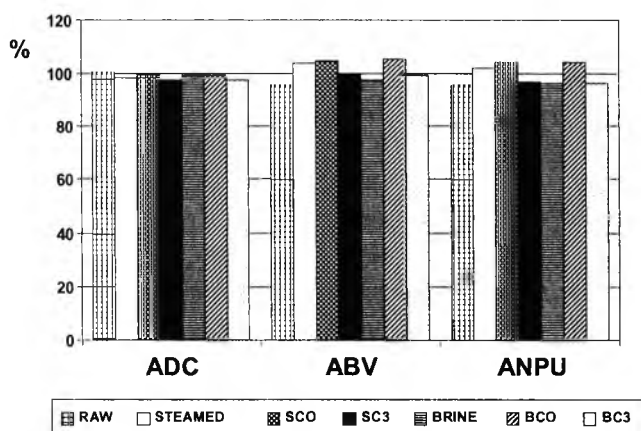
The stability of these results can be comparatively seen in Figure 1. The coefficients ADC, ABV and ANPU of each raw and processed tuna sample have been recalculated, assigning a value of 100 to the casein reference.

This protein stability after storage seems to contrast with the results obtained from an earlier project in our laboratory, in which we studied the nutritional value of canned tuna of the same species but made up of red and white meat, therefore with a higher fat content (24.8 g to 100 g dry matter). Storage of this type of canned tuna for 3 years produced in the coefficients AVB and ANPU a significant decrease of approximately 16% (7). We think that the different conduct of the tuna samples used by García-Arias et al., (7) and those used in the present study is due to the difference in fat and

hemic iron contents. Red meat is richer in fat and iron than white, and therefore reaction among the oxidation products of lipids catalyzed by hemic iron (12,24,25) occurred sooner in the storing of mixed red and white meat.

FIGURE 1

Reduced coefficients of digestibility (ADC), biological value (ABV), and net protein utilization (ANPU), with respect to the value of 100 assigned to the casein reference



By comparing the results obtained in both studies, we may conclude that protein quality deterioration in canned tuna during storage is greater when the canned product

contains a higher percentage of red meat, and therefore, fat. Thus we suggest that one of the factors to take into consideration in order to establish an expiration date for canned tuna with reference to its protein quality would be the fat content of the sample that is canned.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors wish to acknowledge most gratefully the "Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo" (Spain). Financial support of this work by the Spanish CAICYT (Project N°516) and CICYT (Project ALI 88-025) is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Gallardo JM, Aubourg SP, Perez Martin RI. Lipid classes and their fatty acids at different loci of Albacore (*Thunnus alalunga*): Effects of precooking. J Agr Food Chem 1989; 37: 1060-1064.
- Aubourg S, Sotelo CG, Gallardo JM. Zonal distribution of fatty acids in albacore (*Thunnus alalunga*) triglycerides and their changes during cooking. J Agr Food Chem 1990; 38: 255-257.
- Carril A. Technological developments in tuna canning and procesing. Infofish-Int 2002; 4: 53-56.
- Medina I, Sacchi R, Aubourg SP. A 1-3C-NMR study of lipid alterations during fish canning: Effect of filling medium. J Sci Food Agr 1995; 69: 445-450.
- Aubourg S, Gallardo JM, Medina I. Changes in lipids during different sterilization conditions in canning albacore (*Thunnus alalunga*) in oil. Int J Food Sci Technol 1997; 32: 427-431.
- Yeun-Suk-Gu, Hyoung-Sik-Yoon, Douck-Choun-Park, Cheong-II-JI, Tae-Yong-Cho, Myung-Chan-Kim, Sung-Jae-You, Saeng-Gyu-Yeo, Seon-Bong-Kim. Effects of muscle types and cooling on discoloration of canned skipjack. Fish Sci 2001; 67: 1145-1150.
- García-Arias MT, Navarro MP, Castrillón AM. Estudio de las variaciones en macronutrientes y valor nutritivo de la proteína de una conserva de atún a los tres años de su preparación. Arch Latinoam Nutr 1991; 40: 1.
- AOAC. Methods of Analysis for Nutritional Labeling. Association of Official Analytical Chemists 1993, Washington, DC.
- Gehrke CW, Wall LL, Absheer JS, Kaiser FE, Zumwalt RW. Focus: Amino acid analysis (sample preparation for chromatography of amino acids: Acid hydrolysis of proteins). JAOCS 1985; 68: 811-820.
- Moore S, Stein WH. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In: Methods in Enzymology, S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds). 1963. pp. 819-824. New York: Academic Press.
- National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 1995, 4th Revised Edn. National, Academy Press, Washington, DC.
- Pigott GM, Tucker BW. Seafood. Effects of technology on nutrition. 1990, Marcel Dekker, Inc. (ed). pp 66-84. New York and Basel.
- Beamonte A, Castrillon AM. Variaciones en el contenido de triptófano en sardina (*Sardina pilchardus*) originadas por los procesos térmicos culinarios. Papel de la grasa. Grasas y Aceites 1989; 40: 194-198.
- Lema ML, Navarro P, Mataix FJ, Varela G. Influencia de los procesos de cocción y desecación a distinta temperatura sobre el valor nutritivo de la proteína de mejillón (*Mytilus edulis*). Arch Latinoam Nutr 1986; 36: 495-504.
- Pirazzoli P, Anbroggi F, Incerti I. Conserve di tonno all'olio: variazione della composizione in funzione del tipo di cottura e influenza della temperatura di magazzinaggio sulla maturazione. Ind Conserve 1980; 55: 279-285.
- Jane Wyatt C, Ronan K. Effects of processing on the sodium: potassium and calcium: phosphorus content in foods. J Agr Food Chem 1983; 31: 415-420.
- Mermelstein NH. Seafood processing. Food Technol 2000; 54: 66-74.
- Steiner M, Asiedu D, Njaa LR. Effect of local processing methods (cooking, frying and smoking) on three fish species from Ghana. Part 11. Amino acids and protein quality. Food Chem 1991; 41: 227-236.
- Seet ST, Duane Brown, W. Nutritional quality of raw, precooked and canned albacore tuna (*Thunnus alalunga*). J Food Sci 1983; 48: 288-289.
- Castrillón AM, Navarro MP, García-Arias MT. Changes in tuna protein quality after canning. J Food Sci 1997; 61: 1250-1253.
- Finot PA. Effects of processing and storage on the nutritional value of food proteins. In: Food proteins and their Applications. 1997, Damodaran S, Paraf A (eds) Marcel Dekker Inc, New York. pp. 551-577.
- Varela G, Pujol A, Moreiras-Varela O. Sobre el valor biológico de la proteína de las sardinas frescas y enlatadas. Anal Bromatol 1963; 15: 117-125.
- Hellendoorn EW, De Groot AP, Slum P. Effect of sterilization and three years storage on the nutritive value of canned prepared meals. Voeding 1996; 30: 44-63.
- O'Brien J, Morrissey PA. Metal ion complexation by products of the maillard reaction. Food Chem 1997; 58: 17-27.
- Alzagtat AA, Alli I. Protein-Lipid interactions in food systems: a review. Int. J Food Sci Nutr 2002; 53: 249-260.

Recibido: 28-06-2002

Aceptado: 10-12-2003

Calcium and magnesium concentrations in mature human milk: influence of calcium intake, age and socioeconomic level

Vítolo M.R., Valente Soares L.M., Carvalho E.B., Cardoso C.B.

Federal University of São Paulo, SP, Brazil - State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

SUMMARY. Concentrations of calcium and magnesium were measured in mature milk, collected between 30 and 90 days after childbirth, from a group of 90 mothers between 14 and 39 years of age, exclusively breastfeeding. The group was divided into three sub-groups: low socioeconomic-level adolescents (LSAd), low socioeconomic-level adults (LSA), and high socioeconomic-level adults (HSA). Each mother's nutritional status was determined using the body-mass index (BMI) and her eating habits, obtained on the basis of a 24-h dietary recall. Adolescent and adult mothers in the low socioeconomic-level group had lower average calcium intake (LSAd = 618.4 ± 555.2 mg and LSA = 679.4 ± 411.4 mg) than adult mothers in the higher socioeconomic-level group (853.6 ± 415.5 mg). The average concentration of calcium in the adolescent mothers' milk (LSAd) was significantly lower (5.30 ± 1.42 mmol Ca/L, $P=0.01$) than that of the two adult groups (LSA = 5.82 ± 1.55 mmol Ca/L and HSA = 6.40 mmol Ca/L). The average magnesium concentrations for all groups did not show significant differences (LSAd = 1.06 ± 0.18 , LSA = 1.16 ± 0.23 and HSA = 1.11 ± 0.23 mmol Mg/L, for $P=0.16$). These results indicate that magnesium concentrations in mature human milk do not seem to depend on maternal nutritional status. The condition of adolescence, however, associated with lower calcium intake by the mother, resulted in lower calcium concentrations in the milk secreted when compared to that of adult mothers.

Key words: Calcium, magnesium, human milk.

RESUMO. Concentrações de cálcio e magnésio em leite humano maduro. Influência da ingestão de cálcio, idade e nível sócioeconômico da nutriz. Concentrações de cálcio e magnésio foram medidas em leite maduro colhido entre 30 e 90 dias após o parto de 90 mães em regime exclusivo de aleitamento ao peito e com idades entre 14 e 39 anos. O grupo de doadoras foi dividido em três sub-grupos: adolescentes de baixo nível sócioeconômico (LSAd), adultas de baixo nível sócioeconômico (LSA), e adultas de alto nível sócioeconômico (HSA). O estado nutricional de cada doadora foi determinado usando o índice de massa corporal (BMI) e seus hábitos alimentares com base em um inquérito recordatório das últimas 24 horas. Mães adolescentes e adultas dos grupos de baixo nível sócioeconômico apresentaram uma ingestão média de cálcio (LSAd = 618.4 ± 555.2 mg e LSA = 679.4 ± 411.4 mg) do que as mães do grupo alto nível (853.6 ± 415.5 mg). A concentração média de cálcio no leite das mães adolescentes (LSAd) foi significativamente mais baixo (5.30 ± 1.42 mmol Ca/L, $P=0.01$) que as mães adultas dos dois outros grupos (LSA = 5.82 ± 1.55 mmol Ca/L e HSA = 6.40 mmol Ca/L). A concentração média de magnésio para todos os grupos não mostrou diferença significativa (LSAd = 1.06 ± 0.18 , LSA = 1.16 ± 0.23 e HSA = 1.11 ± 0.23 mmol Mg/L, for $P=0.16$). Estes resultados indicam que a concentração de magnésio em leite humano maduro não parece depender do estado nutricional materno. No entanto, a condição de adolescência associada a uma ingestão mais baixa de cálcio pela mãe resultou em concentrações mais baixas de cálcio no leite secretado quando comparado ao leite de mães adultas.

Palavras chave: Cálcio, magnésio, leite humano.

INTRODUCTION

Human breast-milk composition is dependent on factors inherent to the lactating process itself and other maternal and gestational factors such as maternal age, nutritional status, diet, parity and gestational age (1). Concentrations of vitamins and minerals in human milk have been found to vary widely around the globe. An extensive review of the subject concluded that there is still controversy about which factors have a bearing on calcium concentrations in human milk (2). It also pointed out that maternal diet, parity and socioeconomic condition have not been correlated with

calcium concentrations in human milk. From the data collected by these authors, calcium and magnesium concentration ranges of 4,99 – 7,48 mmol/L and 1.23-1.64 mmol/L and, respectively, are to be expected for well-nourished women and are supposedly not affected by intake of the mineral in the diet or in supplements.

Studies conducted in Brazil did not find differences in calcium and magnesium concentrations in colostrum from well-nourished and undernourished mothers from diverse socioeconomic conditions (3,4). On the other hand, colostrum from adolescent mothers under 17 years of age showed higher calcium and magnesium concentrations than colostrum from

mothers aged between 17 and 20 years (5). The first-known report in the literature on calcium concentrations in adolescent mothers' mature milk reported higher concentrations of calcium for this group than other age groups (6).

The mechanisms that control nutrient synthesis in the mammary gland are subject to maternal, gestational and environmental factors (1). Owing to the number and complexity of the factors involved, special care is necessary to isolate the key factors that determine the composition of human milk. The objective of the present study was to evaluate how the state of adolescence, intake of calcium by the lactating mother and socioeconomic situation affected the concentrations of calcium and magnesium in mature milk when the parity and nutritional-state variables were controlled.

MATERIALS AND METHODS

Milk donors

The study group consisted of ninety primiparous mothers, between 14 and 39 years of age, and lactating for between 30 and 90 days, with infants being exclusively breastfed. The criteria for inclusion were that the subjects be healthy, non-smoking, using no medications or vitamin supplements during pregnancy or after, with single-conception pregnancy, childbirth and post-partum occurring normally; , and who showed an acceptable body-mass index (> 19 kg/ m²). The donors were classified in three groups: low socioeconomic-level adolescent (LSAd, < 19 years old), low socioeconomic-level adult (LSA), and high socioeconomic-level adult (HSA). The LSAd and LSA groups were recruited among patients of public institutions oriented toward caring for the underprivileged and the HSA group among patients of private clinics. Among the low socioeconomic-level mothers, 74.2% of LSAd and 41.9% of LSA had not finished primary school and none had a university degree; 35.5% of LSAd and 51.6% of LSA were married. Among the high socioeconomic-level (HSA) group, 50% had university degrees, 90% were married and 80% pursued careers outside their homes. All donors agreed to take part in the study.

Sample collection

Samples of mature milk were collected by manual expression of both breasts for several days, and at different times during the afternoon, to account for variations that might occur at regular times of the day, until a pool of 150 mL was reached for each subject. The milk was collected directly into propylene flasks with screw tops, previously washed by immersion in neutral detergent (Extran, Merck) for 24 hours. The snap caps were then rinsed with deionized water and soaked in nitric acid solution (1:1) for another 24 hours. Again they were washed with deionized water and dried in an oven at 40°C. The samples were stored at - 20°C until analysis .

Calcium and magnesium determinations

The samples (1 mL) were mixed with 10 mL of concentrated nitric acid, heated by infrared radiation until the digestion was completed, and the acid was allowed to dry. The residues were dissolved in concentrated nitric acid and enough lanthanum solution was added give a final concentration of 1.0% of nitric acid and 0.5% of lanthanum when the solutions were taken to volume in volumetric flasks. The concentration of calcium and magnesium was measured using a Perkin Elmer, model 5100 PC, flame atomic-absorption spectrophotometer, fitted with a deuterium background corrector. Duplicate determinations were made. For analytical control, NIST 1549 non-fat milk powder reference material was analyzed under the same conditions (Table 1). Each group of analyses included an in-house reference material (whole cow milk), previously analyzed 15 times on different days. The results indicated the adequacy of the procedure used.

TABLE 1
Results of the certified sample analysis (Non-fat milk powder, NIST 1549) by atomic absorption spectrometry

Material	Origin No. Analyses	Certified value (%)		Value found (%)	
		Ca	Mg	Ca	Mg
Non-fat milk powder	NIST 1549 3	1.30 ± 0.05	0.12 ± 0.03	1.34 ± 0.20	0.114 ± 0.002

TABLE 2
Calcium intakes and calcium concentration in milk of adolescent and adult mothers of different social and economic levels.

Calcium intake (mg)	<400	400 – 800	>800
Number of subjects In each group	26	31	33
Average calcium level in milk (mmol/L)	5.80 ± 1.48	5.85 ± 1.66	5.83 ± 1.40

p=0.99 ns

Dietary recall

The dietary intake was calculated on the basis of a 24-h recall by each subject, using the Program for Nutrition Support, Version 2.5, from the Health Data Center, Federal University of São Paulo, Brazil. The dietary calcium and magnesium intake for each subject was compared with the dietary reference intakes of the American Food and Nutrition Board (7).

Statistical analysis

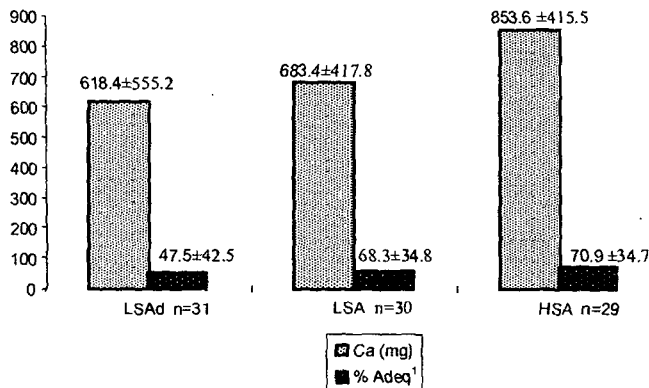
The Kruskal Wallis test was applied to compare the calcium concentrations found in milk samples from each group (LSAd, LSA, HSA) with respect to the age, socioeconomic level and daily calcium intake variables (< 400 mg, 400 – 800 mg, and >800 mg). Within each group the test was conducted to check for correlations between the calcium intake by the mothers and the calcium concentration in the milk. The null hypothesis level was set at 0.05 (7).

RESULTS

The analysis of the diet showed that the calcium intake was lower ($p=0,02$) for both groups of low socioeconomic-level mothers, adolescents ($618,4\pm555,2$) and adults ($683,34\pm417,8$) when compared with high socioeconomic-level mothers ($853,6\pm415,2$) (Figure 1).

FIGURE 1

Average calcium intake (mg) and adequacy (%) of calcium intake recommended to lactating mothers according to age and socioeconomic level

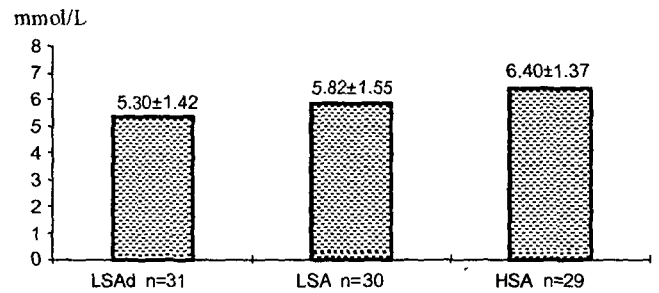


1. Adequacy in calcium intake according to the dietary reference intake of the Food and Nutrition Board (7) ($p = 0.02$, LSAd; LSA < HSA)

The concentration of calcium in the milk of the adolescent group (LSAd) was 5.30 ± 1.42 mmol/L and significantly lower ($p = 0.01$) than the concentrations in the adult groups (LSA = 5.82 ± 1.55 mmol/l and HSA = 6.40 ± 1.37 mmol/L) (Figure 2). For magnesium levels, however, there was no significant difference between the donor groups (LSAd = 1.06 ± 0.18 mmol/L, LSA = 1.16 ± 0.23 mmol/L, and HSA = 1.11 ± 0.23 mmol/L, at $p = 0.16$) (Figure 3). No correlation was found between the calcium intake by the mothers and the calcium concentration in milk for all groups (LSAd- $p=0.86/r^2=0.00$; LSA- $p=0.51/r^2=0.015$; HAS- $p=0.97/r^2=0.00$).

FIGURE 2

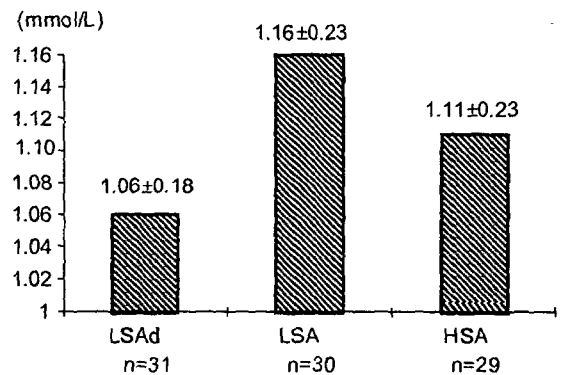
Average concentrations of calcium in (mmol/L) mature milk according to the mother's age and socioeconomic level (LSAd = Low socioeconomic level adolescents, LSA = low socioeconomic level adults, HSA = high socioeconomic level adults)



$p=0.01$ (LSAd < LSA;HSA)

FIGURE 3

Average concentrations of magnesium (mmol/L) in mature milk according to the mother's age and socioeconomic level (LSAd = Low socioeconomic level adolescents, LSA = low socioeconomic level adults, HSA = high socioeconomic level adults)



$p=0.16$ ns

DISCUSSION

The present study found smaller calcium concentrations in milk secreted by adolescent mothers when compared to the two groups of adults. The calcium intake by adolescent mothers was below the reference intake and was the lowest when compared to the two adult groups. But still no correlation was observed between calcium intake by the adolescent mothers and the calcium concentration in milk. Studies conducted in Gambia showed no connection between

low calcium intakes by mothers during the lactating period and calcium concentrations in their milk. On the other hand, the intake of calcium during pregnancy seemed to have a direct bearing on calcium in milk concentrations (8,9). Calcium levels in human milk have been found to vary from 6.32 to 10.75 mmol/L (10,11).

Lower calcium intake by Nepalese lactating mothers did adversely affect the concentrations of calcium in the milk secreted. A greater capability for mobilization of stored calcium was pointed out as the probable cause, since higher levels of hydroxyproline were found in the mothers' urine (12). A lower calcium intake during the three last months of pregnancy was correlated with higher alkaline phosphatase levels in serum during lactation in Spanish women (13). On the other hand, no correlation was found between calcium concentrations in milk and mobilization of bone calcium by secretion of hormones involved in calcium metabolism (1,25 dihydroxycholecalciferol, parathyroid hormone, and carrier proteins) (14,15). Specific parathyroid hormone protein fractions did correlate with calcium concentrations in human milk (16). A previous study had shown that higher levels of calciotropic hormones were present in lactating adolescents. The results suggest that their incomplete growth may limit the calcium turnover in lactation metabolism (17). A recent proposal for reference intake of calcium during breastfeeding has taken into consideration the nursing adolescent (1300 mg/day as advised reference intake) as a risk group for calcium metabolism but not nursing adults (1000 mg/day as advised reference intake) (7). It should be noticed that the reference intake of calcium for nursing adult women is not different from that of non-nursing adult women. The nutrient requirement is known to be higher in all women that are breastfeeding. However, the reference intake for calcium has not been modified due to the higher availability that occurs in the organism of nursing women in this period, at least in the case of adult mothers.

The present study has confirmed other reports that magnesium concentrations in human milk do not depend on maternal conditions and appear constant when different groups are compared. For calcium, the results indicate that the state of adolescence, associated with lower calcium intakes, causes lower calcium concentrations in milk, although the average concentrations found are adequate to supply the infants' needs. In conclusion, adolescent mothers may be considered a risk group in terms of calcium concentrations in mature milk and should be advised to consume foods considered good sources of calcium during pregnancy and lactation. Further studies involving bone metabolism are necessary to clarify the results of the present study.

ACKNOWLEDGEMENTS

E.B. Carvalho and C.B. Cardoso gratefully acknowledge the undergraduate research scholarships received from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. Lawrence R.A. Breastfeeding. A guide for the medical profession. St. Louis, Mosby, 1985. 601 p.
2. Bates CJ, Prentice A. Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. *Pharmac Ther.* Vol. 62, pp. 1994;193-220.
3. Escrivão, M.Mas, Queiroz SS, Nóbrega FJ, Vítolo MR, Fisberg M, Lopez FA. Concentrations of iron, zinc, copper, calcium, phosphorus and magnesium in the colostrum of adult mothers from two socioeconomic levels in Nóbrega F.J. *Human Milk Composition*, Revinter, 1996.
4. Vítolo MRV, Nóbrega FJ, Ancona Lopez F. Colostrum composition (Total Fat, Total Energy, Immunoglobulin, Zinc, Calcium and Fatty Acids) of High and Low Socioeconomic Level, Eutrophic and Malnourished Adult Nursing Mothers. In: Nobrega, FJ. *Human Milk Composition*. Revinter, São Paulo, 1996. p. 120-134.
5. Gouvêa LC, Queiroz SS, Nóbrega FJ, Novo NF. Calcium, magnesium and phosphorus content of colostrum from high and low socioeconomic level adolescent mothers in Nóbrega F.J.. *Human Milk Composition*, Revinter, 1996.
6. Lipsman S, Dewey KG, Lönnerdal B. Breast-feeding among teenage others: milk composition, infant growth and maternal dietary intake. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 1985;4:426-34.
7. Institute of Medicine (IOM), Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride*. Washington, DC:National Academy Press, 1997.
8. Prentice A, Jarjou LMA, Cole TJ, Stirling DM, Dibba B. Calcium requirements of lactating Gambia mothers: effects of calcium supplement on breast-milk calcium concentration, maternal bone mineral content, and urinary calcium excretion. *Am J Clin Nutr.*; 1995;62:58-67,1995.
9. Prentice A, Dibba B, Jarjou LMA, Laskey MA, Paul A A. Is breast milk calcium concentration influenced by calcium intake during pregnancy?. *The Lancet*. Vol 344,1994.
10. Prentice A, Barclay DV. Breast-milk calcium and phosphorus concentrations of mothers in rural Zaire. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1991; 45,611-617.
11. Carias D, Velásquez G, Cioccia AM, Piñero D, Inciarte H, Hevia P. Variaciones temporales en la composición y aporte de macronutrientes y minerales en leches maternas de mujeres venezolanas. *Arch Latinoamer Nutr.* Vol. 47 n° 2, 1997.
12. Moser P, Reynolds RD, Acharya S, Howard PAT, Andom MB. Calcium and Magnesium dietary intakes and plasma and milk concentrations of Nepalese lactating women. *Am J Clin Nutr.* 1988;47:735-9.

13. Ortega RM, Martinez RM, Quintas M.E, López Sobaler AM, Andrés P. Calcium levels in maternal milk: relations with calcium intake during the third trimester of pregnancy. *Br J Nutr.* 1998;79 (6): 501-7.
14. RITCHIE LD, Fung BPH, Turnlund JR, Loan MDV, Cann CE, King JC. A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. *Am J Clin Nutr.* 1998;67: 693-701.
15. Seki K, Kato T, Sekiya S, Makimura N, Kudoh K, Furuya K, Nagata I. Parathyroid-hormone related protein in human milk and its relation to milk calcium. *Ginecol Obstet Invest.* 1997;44(2):102-6.
16. Uemura H, Yasui T, Yoneda N, Irahara M, Aono T. Measurement of N- and C-terminal-region fragments of parathyroid hormone-related peptide in milk from lactating women and investigation of the relationship of their concentrations to calcium in milk. *J Endocrinol.* 1997; 153:445-51.
17. Chan GM, McMurry M, Westover K, Engelbert-Fenton K, Thomas R. Effects of increased dietary calcium intake upon the calcium and bone mineral status of lactating adolescent and adult women. *Am J Clin Nutr.* 1987;46:319-23.

Recibido:19-07-2002

Aceptado: 14-08-2003

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 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 (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. 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

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

Métodos

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

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

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

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

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

Estadística. Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición

(por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información cuantitativa importante. Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado. Las descripciones generales de los métodos utilizados deben aparecer en la sección de métodos. Cuando resuma los datos en la sección de resultados, especifique los métodos estadísticos que se emplearon para analizarlos. Limite el número de cuadros y figuras al mínimo necesario para explicar el tema central del artículo y para evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las gráficas y los cuadros. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra». Defina los términos, las abreviaturas y la mayor parte de los símbolos estadísticos.

Resultados

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

Discusión

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

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

Agradecimientos

En un lugar adecuado del artículo (como nota al pie de la primera

página o como apéndice del texto; véanse los requisitos de la revista) uno o varios enunciados especificarán lo siguiente. 1) las colaboraciones que deben ser reconocidas pero que no justifican la autoría, tales como el apoyo general del jefe del departamento; 2) el reconocimiento por la ayuda técnica recibida; 3) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; y 4) las relaciones que puedan suscitar un conflicto de intereses (véase «Conflicto de intereses»).

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

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

Referencias

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

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

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

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

por escrito. Los autores verificarán las referencias cotejándolas contra los documentos originales.

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

Artículos de revista

1. Artículo de revista ordinario

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

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

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

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

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

Más de seis autores:

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

2. Organización como autor

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

3. No se indica el nombre del autor

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

4. Artículo en idioma extranjero (2)

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

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

5. Suplemento de un volumen

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

6. Suplemento de un número

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

7. Parte de un volumen

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

8. Parte de un número

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

9. Número sin volumen

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

10. Sin número ni volumen

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

11. Paginación en números romanos

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

12. Indicación del tipo de artículo, según corresponda

Enzensber er W, Fischer PA. Metronome in Parkinson,s disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

13. Artículo que contiene una retractación

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin

(2) Evidentemente "extranjero" se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencia bibliográfica se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos (N. Del t.).

gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. En: Nat Genet 1994;6:426-31]. Nat Genet 1995;11: 104.

14. Artículo retirado por retractación

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado por retractación en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3127]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:1083-8.

15. Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en West J Med 1995;162:278]. West j Med 1995; 162:28-31.

Libros y otras monografías

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser.)

16. Individuos como autores

Ringsven-MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. Directores ("editores"), compiladores como autores

Norinan IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

18. Organización como autor y editorial

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

19. Capítulo de libro

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver prescribía el uso de dos puntos en vez de la letra p antes de las páginas.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

20. Actas de conferencias

Kimura j, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology, Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

21. Artículo presentado en una conferencia

Bengtsson S, Tolheim BG. Enforcement of data protection, privacy

and security in medical informatics. En: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. Informe científico o técnico

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora: Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:

Field MjJ Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. Tesis doctoral

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

24. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.

Otros trabajos publicados

25. Artículo de periódico

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. Documentos legales

Ley pública:
Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:
Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1 st Sess. (1995).

Código de normas federales:
Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

28. Mapa

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. Libro de la Biblia

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. Diccionarios y obras de consulta semejantes

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. Obras clásicas

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Trabajos inéditos**32. En prensa**

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

Material en soporte electrónico**33. Artículo de revista en formato electrónico**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 51;1(1):24 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

34. Monografía en formato electrónico

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

35. Fichero de computadora

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Cuadros

Mecanografía o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, 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.) 0 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

LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICION (SLAN)

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN) fue creada el 10 de Noviembre de 1965 en ocasión de celebrarse el Primer Congreso de Nutrición del Hemisferio Occidental. El actual Consejo Directivo de la SLAN (2004-2006) está constituido por los siguientes miembros:

Presidente	Helio Vannucchi
Vicepresidente (Presidente Electo)	Eduardo Atalah S.
Secretario General	Julio Sergio Marchini
Tesorero	Pedro Eder Portari Filho
Presidente Saliente	Adolfo Chávez Villasana

DIRECTORIO DE ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION

Editor General	José Félix Chávez Pérez
Editor Asociado	Maritza L. de Jiménez

MIEMBROS DEL CUERPO EDITORIAL. PERIODO 2004-2006

Juan de Dios Alvarado	Ileana Holst Schumacher
Hugo Amigo A.	Franco M. Lajolo
Héctor Araya	Luis López Valladares
María Laura Arias E.	María L.P. Martín de Portela
Jaime Ariza M.	Lilia Masson Salaué
Guillermo Arroyave	Reynaldo Martorell
Denis Barclay	Josefina Morales de León
José María Bengoa	María del C. Morasso
Adriana Blanco M.	Rosa María Ortega A.
Odilia Bermudez	Saturnino de Pablo
Héctor Bourges R.	Ingrid R. de Paoli
Ricardo Bressani	Nelly Pak
Jesús Bulux	Emma W. de Penna
Benjamín Caballero	María Ester Río
Ana M. Calderón de la Barca	Delia Rodríguez-Amaya
Esther Casanueva	Manuel Ruz
Germán Camejo	María Elena Sambucetti
Eduardo S. Castro Montero	Elba Sangronis
Fanny Carrillo de Padilla	Teresa Shamah Levi
Sara J. Closa	Nilson E. de Sousa
Louella Cunningham	Nora Slobodianik
Elizabet Dini G.	Liseti Solano R.
Juan Ignacio Egaña	Noel W. Solomons
Patricia R. de Ferrer	Armando Tovar
María N. García Casal	Juseclino Tovar
Eglis González G.	Luiz C. Trugo
Marisa Guerra M.	Mirtha E. Valencia
Werner G. Jaffé	Mauro Valencia J.
Gladys Henríquez P.	Mario Villarroel T.
Pilar Hernández S.	Carolyn Jane Wyatt
Eva Hertrampf	Enrique Yáñez S.
Patricio Hevia Opazo	Liliana Zago

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Volumen 54. N° 1, Marzo 2004

Contenido

Páginas

EDITORIAL	5
XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición	6
ARTICULOS GENERALES	
Nuclear and isotopic techniques application used in supporting nutritional studies in Latin America countries N. Mokhtar, J. Gerardo-Abaya, B. Miranda da-Cruz, Seong-Ai Kim, G.V. Iyengar	9
La pica durante el embarazo: un trastorno frecuentemente subestimado Laura Beatriz López, Carlos Rafael Ortega Soler, María Luz Pita Martín de Portela	17
Lactação e álcool: Efeitos clínicos e nutricionais Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos, Francisca Martins Bion, Florisbela Campos	25
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Nutrición Humana	
Papel del frijol negro <i>Phaseolus vulgaris</i> en el estado nutricional de la población guatemalteca José Serrano e Isabel Goñi	36
Prematurity and maternal folate deficiency: Anemia during pregnancy study group results in Valencia, Venezuela Arturo Martí-Carvajal, Guiomar Peña-Martí, Gabriella Comunán-Carrasco, Sergio Muñoz-Navarro, Mariana Luco, BChem, Arturo Martí-Peña, Carolina Medina-Laurentín	45
Nutrición Experimental	
Índice epidemiológico de nutrición infantil basado en un modelo polinomial de los valores de puntuación Z del peso para la edad Avila-Curiel A., Shamah T, Barragán L, Chávez A., Avila MA., Juárez L.	50
Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos Larissa Ribeiro Braga, Maria Alice Rostom de Mello, Claudio Alexandre Gobatto	58
Alimentación Complementaria	
Evaluación del impacto nutricional del programa de alimentación complementaria de Panamá en niños menores de 5 años Eira de Caballero, Odalis Sinisterra, Francisco Lagrutta, Eduardo Atalah S.	66
Inocuidad de Alimentos	
Diseño de un plan de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) para el aseguramiento de la inocuidad de la mortadela elaborada por una empresa de productos cárnicos Lizet Bou Rached, Norelis Ascanio, Pilar Hernández	72
Ciencia de Alimentos	
Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de <i>Phaseolus lunatus</i> L. Santiago Gallegos Tintorcé, Jessé Pacheco Aguirre, David Betancur Ancona y Luis Chel Guerrero	81
Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente Lorena R. Agostini, María J. Morón Jiménez, Adriana N. Ramón, Antonio Ayala Gómez	89
Tecnología de Alimentos	
Caracterización de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva Rafael Canett Romero, Ana Irene Ledesma Osuna, Rosario Maribel Robles Sánchez, Rafael Morales Castro, Lijiana León-Martínez, Rosaura León-Gálvez	93
LatinFoods. Composición de Alimentos	
El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes Cynthia Cristina Arcila-Lozano, Guadalupe Loarca-Piña, Salvador Lecona-Urbe y Elvira González de Mejía	100
Effects of different thermal treatments and storage on the proximate composition and protein quality in canned tuna García-Arias M.T, Navarro M.P., García-Linares M.C.	112
Calcium and magnesium concentrations in mature human milk: influence of calcium intake, age and socioeconomic level Vítolo M.R., Valente Soares L.M., Carvalho E.B., Cardoso C.B.	118
INFORMACION PARA LOS AUTORES	123