

Volumen 54. N° 4. Diciembre 2004

ALAN

A R C H I V O S

Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

L A T I N O A M E R I C A N O S

Continuación de Archivos Venezolanos de Nutrición

D E N U T R I C I O N



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

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




Dirección: Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Apartado 62.778. Chacao.
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
-  América Latina
-  **PRODUCTOS ROCHE**, América Latina
- **Fundación POLAR**
- **Centro de Atención Nutricional Infantil Antimano. 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

DICIEMBRE 2004

Nº 4

Contenido

Páginas

ARTICULOS GENERALES

Armonización de las Recomendaciones Nutricionales para Mesoamérica: ¿Unificación regional o individualización nacional?

Noel W. Solomons, Martha Kaufer-Horwitz and Odilia I. Bermúdez 363

Efectividad de un programa nacional de fomento de la lactancia materna en Chile 1993-2002

Eduardo Atalah S., Cecilia Castillo L., Cecilia Reyes A. 374

El té verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares?

Tania T. Hernández Figueroa, Elena Rodríguez-Rodríguez, Francisco J. Sánchez-Muniz 380

Hospital food handlers in Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Ana Eliza Port Lourenço, Claudia Maria Antunes Uchoa. Otilio Machado Pereira Bastos 395

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Nutrición Humana

Impact of the hypocaloric diet using food substitutes on the body weight and biochemical profile

Mauro Fisberg, Cecilia Lacroix de Oliveira, Isa de Pádua Cintra, Gabriela Losso, Milena Baptista Bueno, Samantha Ottani Rhein, Priscila Maximino 402

Nutrición Clínica

Excreción urinaria de deoxipiridinolina y su relación con la densidad mineral ósea, el estradiol sérico y los años de postmenopausia en mujeres mexicanas

Rosa Olivia Méndez Estrada y C. Jane Wyatt 408

Efecto de la suplementación oral con cobre en el perfil lipídico de pacientes venezolanos hiperlipémicos

Alarcón-Corredor OM, Guerrero Y, Ramírez de Fernández M, D' Jesús I, Burguera M, Burguera JL, Di Bernardo ML, García MY y Alarcón AO 413

Bioquímica Nutricional

Níveis plasmáticos de vitamina A e os resultados obstétricos e perinatais em gestantes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Patrícia El Beitune, Geraldo Duarte, Hélio Vannucchi, Silvaña Maria Quintana, Ernesto Antonio Figueiró-Filho, Edson Nunes de Moraes, Antonio Alberto Nogueira 419

Microbiología de Alimentos

Prevalencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidos y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica

Melvin Calvo, Melissa Carazo, María Laura Arias, Carolina Chaves, Rafael Monge y Misael Chinchilla 428

Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica

Graciela Morales, Laura Blanco, María Laura Arias y Carolina Chaves 433

Ciencia de Alimentos

Adaptabilidad de híbridos de maíz dulce a la congelación en mazorcas

Alejandra O. Ramírez Matheus, Norelkys Maribel Martínez, Ligia O. de Bertorelli, Frank De Venanzi 438

Detección de plaguicidas en vegetales de Costa Rica mediante la inhibición de colinesterasas humanas

Karl Schosinsky Nevermann y Eugenia Quintana Guzmán..... 444

LatinFoods. Composición de Alimentos

Physicochemical properties of Venezuelan breadfruit (*Artocarpus altilis*) starch

Alicia Mariela Rincón, Fanny C. Padilla 449

INFORMACION PARA LOS AUTORES 457

INDICE GENERAL DEL VOLUMEN 54, 2004 464

INDICE DE AUTORES 470

INDICE DE MATERIAS 477

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 54

DECEMBER 2004

Nº 4

Contents

Pages

GENERAL ARTICLES

Harmonization for Mesoamerican Nutrient-Based Recommendations: ¿Regional unification or national specification?

Noel W. Solomons, Martha Kaufer-Horwitz and Odilia I. Bermúdez 363

Efficacy of a national program to promote breast feeding: Chile 1993-2002

Eduardo Atalah S., Cecilia Castillo L., Cecilia Reyes A. 374

The green tea, a good choice for cardiovascular disease prevention?

Tania T. Hernández Figueroa, Elena Rodríguez-Rodríguez, Francisco J. Sánchez-Muniz 380

Hospital food handlers in Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Ana Eliza Port Lourenço, Claudia Maria Antunes Uchoa. Otilio Machado Pereira Bastos 395

RESEARCH PAPERS

Human Nutrition

Impact of the hypocaloric diet using food substitutes on the body weight and biochemical profile

Mauro Fisberg, Cecilia Lacroix de Oliveira, Isa de Pádua Cintra, Gabriela Losso, Milena Baptista Bueno, Samantha Ottani Rhein, Priscila Maximino 402

Clinical Nutrition

Relationship of deoxy pyridinole excretion with bone density, serum estradiol and years of postmenopause in Mexican postmenopausal women

Rosa Olivia Méndez Estrada y C. Jane Wyatt 408

Effect of copper supplementation on lipid profile of Venezuelan hyperlipemic patients

Alarcón-Corredor OM, Guerrero Y, Ramírez de Fernández M, D'Jesús I, Burguera M, Burguera JL, Di Bernardo ML, García MY y Alarcón AO 413

Nutritional Biochemistry

Serum vitamin A during pregnancy and effects on obstetrics and perinatal outcomes in HIV infected pregnant women

Patrícia El Beitune, Geraldo Duarte, Hélio Vannucchi, Silvana Maria Quintana, Ernesto Antonio Figueiró-Filho, Edson Nunes de Moraes, Antonio Alberto Nogueira 419

Food Microbiology

Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp, microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica

Melvin Calvo, Melissa Carazo, María Laura Arias, Carolina Chaves, Rafael Monge y Misaél Chinchilla 428

Bacteriological evaluation of fresh tilapia (*Oreochromis niloticus*) coming from the northern region of Costa Rica

Graciela Morales, Laura Blanco, María Laura Arias y Carolina Chaves 433

Food Science

Adaptability of sweet corn ears to a frozen process

Alejandra O. Ramírez Matheus, Norelkys Maribel Martínez, Ligia O. de Bertorelli, Frank De Venanzi 438

Pesticide detection in Cost Rican vegetables based on the inhibition of serum and erythrocytic human cholinesterases

Karl Schosinsky Nevermann y Eugenia Quintana Guzmán 444

LatinFoods. Food Composition

Physicochemical properties of Venezuelan breadfruit (*Artocarpus altilis*) starch

Alicia Mariela Rincón, Fanny C. Padilla 449

INFORMATION FOR AUTHORS 457

GENERAL INDEX OF VOLUME 54, 2004 464

AUTHOR INDEX 470

SUBJECT INDEX 477

Armonización de las Recomendaciones Nutricionales para Mesoamérica: ¿Unificación regional o individualización nacional?

Noel W. Solomons, Martha Kaufer-Horwitz and Odilia I. Bermúdez

Centro de Estudios en Sensoriopatías, Senectud, Impedimentos y Alteraciones del Metabolismo (CESSIAM), Guatemala, Guatemala, Fundación Mexicana para la Salud, Distrito Federal, México y Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Boston, MA, EUA.

RESUMEN. Mesoamérica, el área de interés de este trabajo, es la sección de América Latina que se extiende desde México hasta Panamá. Las deliberaciones de comités internacionales constituyen las principales bases para el establecimiento de recomendaciones de nutrimentos. En menor grado, se han considerado las particularidades de biodisponibilidad de los distintos nutrimentos. Las recomendaciones de nutrimentos en la región son "relativamente" uniformes y consistentes con respecto al hierro, al yodo y a la mayoría de las vitaminas del complejo B. Pero existen discrepancias con las recomendaciones promulgadas para otros nutrimentos. Una base válida para la armonización no sería la unificación de las recomendaciones a lo largo de Mesoamérica, sino la certeza de que la recomendación del nutrimento proporcionará su adecuada disponibilidad y/o llenará las reservas corporales de manera óptima para la supervivencia, el crecimiento, el bienestar y la función dentro del nicho ecológico de los grupos de población de la región. El hecho de que las recomendaciones de nutrimentos deben satisfacerse a partir de los alimentos, que sean accesibles y aceptables culturalmente y que se aproximen a las demandas paralelas de las recomendaciones basadas en alimentos, representa un reto adicional.

Palabras clave: Recomendaciones nutricionales, ingesta dietética de referencia, requerimientos, Mesoamérica, América Latina.

SUMMARY. Harmonization for Mesoamerican Nutrient-Based Recommendations: ¿Regional unification or national specification?. Mesoamerica, the area we focus for this paper, is a section of Latin America that extends from Central Mexico to Panama. The deliberations of international committees are the primary bases for their nutrient-based recommendations. To a smaller extent, the unique particularities of the bioavailability for one or another nutrient have been considered. The nutrient recommendations throughout the region are "relatively" uniform and mutually consistent with respect to: iron, iodine and most of the B-complex vitamins. Discrepancies exist among the various sets of recommendations for other nutrients. A valid basis of harmonization would not be unification of recommendations across all nationalities, but rather assuring a consistency in the nutrient profile that is recommended provides the nutrient exposures and/or fills the body's reserves as best suits the goals of survival, growth, well-being and function within the ecological niche of the population. That the recommendations for nutrients must be satisfied from foods, foods that are accessible and culturally acceptable, and that approximate the parallel demands of food-based dietary guidelines, add additional constraints onto the process of enunciating the former.

Keywords: Nutrient recommendations, dietary reference intakes, recommended dietary allowances, Mesoamerica, Latin America.

INTRODUCCION

América Latina está constituida por 19 países y un territorio (Puerto Rico) que tienen vínculos culturales y lingüísticos con la península ibérica (España y Portugal). Su territorio se extiende desde el Río Bravo y el Mar Caribe hasta la punta más al sur de América del Sur (Tierra del Fuego). Incluye alrededor de 184 millones de habitantes de habla portuguesa residentes en Brasil y de 304 millones de habitantes de habla hispana en el resto de los países y tiene un crecimiento anual de 1.7%. Esta es la extensión de la población que debe cumplir con recomendaciones de ingesta diaria de nutrimentos para asegurar un estado nutricional adecuado para la región. De la población general de América Latina, aproximadamente 140 millones de individuos viven en la región mesoamericana (1).

En este trabajo, hemos dirigido nuestra atención a las

propuestas de recomendaciones basadas en nutrimentos para la población mesoamericana, a los esfuerzos que se han hecho en este terreno y a los lineamientos que se han diseminado. Hemos aprovechado la diversidad ecológica y étnica de la región mesoamericana para ilustrar algunas consideraciones teóricas relativas a la conveniencia de establecer recomendaciones nutricionales para toda la región, colocando el término "armonización" en el contexto de diversidad más que de unidad. Por último, reconocemos que el aspecto de las "recomendaciones basadas en nutrimentos" es solamente parte del paradigma actual para proporcionar recomendaciones a la población, ya que éstas se han complementado en tiempos recientes con "guías alimentarias basadas en alimentos" y con íconos de grupos de alimentos. En este análisis, no podemos ignorar los conflictos o sinergias que puedan existir entre los primeros conceptos y los últimos, especialmente cuando se

trata de preservar la cultura alimentaria tradicional de la herencia mesoamericana en un mundo globalizado.

La armonización y el proceso de la generación de recomendaciones basadas en nutrimentos para América Latina

La Fundación Cavendes en Venezuela fue pionera en la promulgación de una guía unificada de recomendaciones nutricionales para toda la región latinoamericana, incluyendo a Mesoamérica. Las deliberaciones de este grupo, encabezado por José María Bengoa, se publicaron en 1989 (2). Como concesión práctica a la noción de que "comemos alimentos, no nutrimentos" (2), este panel aseveró que, al menos en la región de América Latina, el patrón de alimentación familiar era aún válido. Ellos argumentaban que las familias no alimentaban de manera distinta o diferencial a los miembros de la familia; excepto en la infancia. Por ende, dado que "toda la familia come del mismo plato", un enfoque para asegurar que todos los miembros del hogar cubrieran simultáneamente sus requerimientos nutricionales sería hacer que el consumo de nutrimentos del hogar sirviera a todos sus miembros.

Esto se basa en la hipótesis de que, con la excepción de infantes, recién destetados y mujeres en etapa de lactancia, los hogares latinoamericanos tendrían una recomendación alimentaria común para toda la familia. Esto necesariamente conduce a la tabulación de las densidades críticas que deberían tener las dietas familiares (Tabla 1). Así, no basaron sus recomendaciones para micronutrimentos en cantidades diarias, sino en densidad energética (mg ó µg por unidades de energía dietaria mixta). El supuesto fue que cualquiera que consumiera sus necesidades de energía automáticamente alcanzaría las recomendaciones para otros nutrimentos, siempre y cuando la dieta fuera lo suficientemente variada. Sin embargo, las recomendaciones finales tenían algunas incongruencias importantes. En el caso del zinc, por ejemplo, la densidad requerida para satisfacer las necesidades de un niño en edad escolar era de 10 mg/1000 kcal (4.18 MJ) si la biodisponibilidad del zinc en la dieta era baja. Sin embargo, con esta densidad como recomendación, un hombre adulto que consumiera 3000 kcal/día (12.54 MJ), consumiría cantidades elevadas del nutrimento (30 mg), y una familia de siete integrantes distribuidos en tres generaciones podría consumir un total de 160 mg de zinc con las 16,000 kcal (66.88MJ) en su ración diaria de alimentos. Pueden observarse consecuencias similares para otros nutrimentos como el yodo. De hecho, podemos contribuir con este esquema de pensamiento para los nutricionistas latinoamericanos convocados por la Fundación Cavendes, ya que los supuestos básicos pueden, de hecho ser ciertos. Lo que también es cierto, es que las entidades más prominentes en la formulación de recomendaciones basadas en nutrimentos, es decir las agencias de las Naciones Unidas (OMS, FAO y UNU) y el Instituto de Medicina de los Estados Unidos en colaboración con el

gobierno de Canadá (3), han desestimado el enfoque basado en densidad energética. Bajo sus supuestos, las diferentes generaciones comen —y deben comer— de manera distinta en una misma mesa.

TABLA 1

Expresión de densidad de nutrimentos para un niño y un adulto según el informe de la Fundación Cavendes.¹

Nutrimento	Densidad	Niño de 2 años	Trabajador
	nutricional crítica (Por 1000 kcal)	Req=1200 kcal	adulto Req=3000 kcal
Vitamina A, RE	300	360	900
Folato, µg	80	96	240
Vitamina C, mg	25	30	75
Calcio, mg	400	480	1200
Hierro, mg	14	16.8	42
Zinc ² , mg	10	12	30
Yodo, µg	100 – 200	240	600

¹Bengoa J, Torún B, Behar M, Scrimshaw N, 1987 (2).

²La recomendación de zinc es para dieta de baja biodisponibilidad.

Propuestas internacionales de recomendaciones basadas en nutrimentos

Debido a que las recomendaciones emanadas de la Consultaría de Cavendes no trascendió en la región, los procesos internacionales que habían iniciado con anterioridad en los Estados Unidos, Canadá y en las agencias de las Naciones Unidas, mantuvieron una importante influencia en la región, incluida Mesoamérica.

La última ocasión en el que las agencias de las Naciones Unidas se combinaron para enunciar recomendaciones basadas en los requerimientos de proteína y energía fue en 1985 (4). James and Schofield (5) convirtieron el informe FAO/OMS/UNU (4) de 1985 en un manual para planificadores y nutricionistas.

En 1998 se reunió en Bangkok un Comité Mixto FAO/OMS de Expertos para una consulta sobre Requerimientos Humanos de Vitaminas y Minerales con el fin de complementar la información de las consultas anteriores, como un primer paso hacia la actualización del manual sobre Requerimientos Nutricionales Humanos de 1994 (6). Las recomendaciones emanadas en este informe preliminar se consideraron provisionales y el informe final se liberó en el año 2001 (7).

Ingestas dietéticas de referencia para Estados Unidos y Canadá

En 1938, el Consejo Canadiense de Nutrición emitió los primeros estándares dietéticos. Sin embargo, al poco tiempo,

el Consejo recomendó la adopción de las Recomendaciones Dietéticas Diarias de Estados Unidos emitidas en 1941 (RDA, por sus siglas en inglés) para la población canadiense. Para el año de 1945, se hicieron evidentes las diferencias conceptuales en el enfoque de las recomendaciones canadienses de nutrimentos (RNI, por sus siglas en inglés) y de las recomendaciones estadounidenses (RDAs). Las versiones últimas de las RNIs canadienses y las RDAs estadounidenses no variaban en las derivaciones de las ingestas recomendadas, aunque aún persistían algunas diferencias en la manera como se describían los usos de ambas (3).

Por otro lado, las RDAs de Estados Unidos se publicaron originalmente en 1941 con el propósito de "proporcionar estándares que sirvieran como una meta para la buena nutrición" y su aplicación original fue como "una guía para aconsejar en lo referente a problemas de nutrición con propósitos de defensa nacional" (8). Las RDAs, cuya última actualización se emitió en 1989 (9), han servido también para otros propósitos; entre ellos, para planificar y procurar abasto alimentario para subgrupos de población, para interpretar registros de consumo de alimentos, para establecer estándares para programas de asistencia alimentaria, para evaluar la adecuación del abasto de alimentos en la industria y para establecer lineamientos para el etiquetado de alimentos (3,8).

Recientemente, estas dos naciones se unieron para crear un enfoque nuevo de los estándares dietéticos de referencia que reemplazara las RDAs y las RNIs. El producto de esta colaboración resultó en la promulgación de las Ingestas Dietéticas de Referencia (en inglés: Dietary Reference Intakes (DRIs), para micro y macro nutrimentos, energía, agua y electrolitos, las que se han divulgado en una serie de seis reportes (9-14). Las diferencias entre las DRI y las RDAs ó las RNIs son: "(1) en los casos donde existen datos específicos sobre seguridad y eficacia, la formulación de la recomendación considera la reducción en el riesgo de enfermedades crónicas degenerativas, en lugar de sólo incluir la ausencia de la deficiencia, (2) los niveles superiores de consumo se establecen en los casos en los que existen datos referentes al riesgo de efectos adversos a la salud, y (3) los componentes de los alimentos que pueden no cumplir con el concepto tradicional de nutrimento pero que pueden tener un posible beneficio a la salud se revisarán, y, ante la existencia de suficientes datos, se establecerán recomendaciones de consumo" (3). Las DRIs incluyen cuatro tipo de recomendaciones" el Requerimiento Promedio Estimado (EAR, por sus siglas en inglés), las RDA, la Ingesta Adecuada (AI, por sus siglas en inglés), y el Nivel Superior Tolerable de Ingesta (UL, por sus siglas en inglés) (3) (Tabla 2).

TABLA 2

Definiciones de las DRI de Estados Unidos y Canadá (3)

Requerimiento Promedio Estimado (EAR, en inglés): nivel promedio de ingesta diaria de un nutrimento estimado para satisfacer el requerimiento de la mitad de los individuos sanos en una etapa particular de la vida, según su sexo.
Recomendaciones Dietéticas Diarias (RDA, en inglés): nivel promedio de ingesta diaria de un nutrimento suficiente para cubrir los requerimientos de cerca de todos (97 a 98 porciento) los individuos sanos en una etapa particular de la vida, según su sexo.
Ingesta Adecuada (AI, en inglés): Se usa cuando, debido a la falta de datos suficientes sobre beneficios y/o riesgos, no es posible determinar el RDA. La AI es recomendación diaria promedio para la ingesta de un nutrimento que se asume como adecuadas para un grupo (o grupos) de personas aparentemente sanas, basada solamente en aproximaciones o estimaciones de ingesta determinadas observacional o experimentalmente.
Nivel Superior Tolerable (UL, en inglés): la máxima ingesta diaria promedio de un nutrimento que no plantea el riesgo de efectos adversos a la salud en la mayoría de los individuos de la población general. A medida que la ingesta aumenta por arriba del UL, el riesgo potencial de efectos adversos aumenta.

Análisis comparativo de las recomendaciones basadas en nutrimentos en la Región Mesoamericana

Para la mayoría de las seis repúblicas de América Central, y de acuerdo con una consulta informal con colegas de instituciones académicas y gubernamentales del istmo, la referencia vigente para las recomendaciones diarias de nutrimentos (Tabla 3) ha sido un documento publicado con motivo del 45° Aniversario del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) (15). Una excepción a lo anterior es el caso de Costa Rica que cuenta con un documento de Metas y Guías Nacionales donde se incluye un número limitado de recomendaciones de ingesta de nutrimentos específicos (vitamina A, calcio, hierro, yodo) combinado con algunos lineamientos para alcanzar una dieta saludable(16). En el caso de México, las recomendaciones nutricionales emitidas en los años noventa han sido revisadas y adoptadas como las nuevas recomendaciones oficiales de 2004, las que se encuentran en vías de publicación y que se dieron a conocer, en su versión preliminar, en noviembre de 2003 en el XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición en Acapulco, México (17).

TABLA 3
Resumen de las categorías de edad para las recomendaciones de nutrimentos de INCAP y México

Categorías	INCAP	México		
Infantes (meses)	0-2.9	0-6		
	3-5.9	7-12		
	6-11.9			
Niños (años)	1-2.9	1-3		
	3-6.9	4-8		
	7-9.9			
	10-11.9			
	12-13.9			
	14-17.9			
		Hombres Mujeres		
	9-13 9-13			
	14-18 14-18			
Adultos (años)	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
	19-30	19-30	18-64.9	18-64.9
	31-50	31-50	65+	65+
	51-70	51-70		
	>70	>70		
Embarazada	Sí		Sí	
Lactante	Sí		Sí	

Al comparar las recomendaciones nutricionales de INCAP con las de México, observamos que los grupos de edad y sus intervalos difieren entre los dos grupos de recomendaciones (Tabla 3). INCAP presenta nueve grupos en el caso de los niños, mientras que México presenta seis pero los separa por sexo a partir de los 9 años de edad. INCAP separa a los adultos por sexo y proporciona diferentes categorías para los adultos jóvenes (18 a 65 años) y para los adultos mayores (más de 65 años). Por su parte México optó también por separar por sexo pero presenta 4 grupos de edad. Ambas regiones mantienen recomendaciones separadas para mujeres embarazadas y madres lactantes.

En este análisis comparativo, hemos elegido las recomendaciones de micronutrimentos (9 vitaminas y 9 minerales) para varones de 25 a 50 años con fines meramente ilustrativos (Tabla 4), aunque tanto el INCAP como México tienen recomendaciones para energía y proteína. Además, las recomendaciones mexicanas también incluyen otros nutrimentos como el cromo y la vitamina K. Para establecer paralelismos y discordancias con las recomendaciones internacionales incluímos en la Tabla 4 las recomendaciones de EUA-Canadá y las de FAO-OMS.

TABLA 4
Recomendaciones de Nutrimentos para INCAP, México, EU-Canadá, y FAO/OMS para hombres de 25 a 50 años de edad

Nutrimento	INCAP ¹	México ²	USA-Canadá ³	FAO/WHO ⁴
Vitaminas				
Vitamina A, µg RE	600	730	900	600
Tiamina, mg	1.2	1.0	1.2	1.2
Riboflavina, mg	1.5	1.1	1.3	1.3
Niacina, NE	20 NE	13 NE	16 NE	16 NE
Vitamina B ₆ , mg	1.4	1.1	1.3	1.53
Folato, µg	200	460	400	400
Vitamina B ₁₂ , µg	1.0	2.4	2.4	2.4
Vitamina C, mg	60	84	90	45
Vitamina D, µg	'sol'	5	5	5
Minerales				
Calcio, mg	800	900	1000	1000
Fósforo, mg	600	560	700	—
Magnesio, mg	310	340	320	260
Hierro, mg	8	15	8	9
Zinc, mg*	12	11	11	7
Yodo, µg	150	120	150	130
Flúor, µg	3	3.05	3	—
Cobre, µg	1200	730	900	—
Selenio, µg	70	48	55	34

* Recomendación para los grupos de 19 a 30 y de 31-50 años

Fuentes:

¹ INCAP, 1994 (15)

² México, 2004 (17)

³ Estados Unidos y Canadá, 1997-2001(9-12)

⁴ FAO/OMS, 2002 (7)

Con el fin de analizar las recomendaciones nutricionales mesoamericanas en términos cuantitativos para hacer comparaciones proporcionales, calculamos la diferencia porcentual de las recomendaciones de Mesoamérica con relación a las recomendaciones de FAO-OMS y a las DRI-RDAs de Estados Unidos y Canadá (Tabla 5). Nuevamente elegimos a los hombres de 25 a 50 años de edad para fines de ilustración. Con respecto a las vitaminas, las recomendaciones del INCAP para América Central solamente están en acuerdo con las otras en el caso de la tiamina. Adicionalmente, las recomendaciones de vitamina A del INCAP son similares a las de FAO-OMS, aunque menores que las DRIs. INCAP recomienda la exposición a la luz solar para cubrir los requerimientos de vitamina D, mientras que los dos grupos de comparación proporcionan recomendaciones de la vitamina a partir de la dieta (como se muestra en la Tabla 4). Las recomendaciones de folato y de vitaminas C, B₁₂ y vitamina

A (solamente al comparar con las DRIs) emitidas por el INCAP, son considerablemente menores que las de los organismos internacionales. Por otro lado, en los casos de riboflavina y niacina, INCAP recomienda cantidades mayores, 15% y 25%, respectivamente, que las DRI-RDA's y las de FAO-OMS. No existe correspondencia con respecto a las recomendaciones de nutrientes inorgánicos entre las tablas centroamericanas de INCAP y los seis elementos comunes listados por las agencias de las Naciones Unidas. La tabla de INCAP concuerda con las DRI-RDAs, para este grupo de edad y sexo, en el caso del hierro, el yodo y el flúor. Las recomendaciones centroamericanas sugieren cantidades mayores de zinc y selenio en comparación con las DRI-RDAs y cantidades considerablemente mayores con respecto a la tabla de FAO/OMS. La cantidad recomendada en EUA-Canadá para calcio y fósforo es mayor que los estándares de Centro América, mientras que la de cobre es menor.

TABLA 5

Análisis comparativo de las recomendaciones nutricionales para hombres de 25 a 50 años, para la región centroamericana y México con las recomendaciones de FAO-OMS y las DRIs de EUA-Canadá

	INCAP		México	
	DRI EUA-CANADA	FAO/OMS	DRI EUA-CANADA	FAO/OMS
Vitaminas				
Vitamina A	-33%	0%	-19%	+22%
Tiamina	0%	0%	-17%	-17%
Riboflavina	+15%	+15%	-15%	-15%
Niacina	+25%	+25%	-19%	-19%
Vitamina B ₆	+8%	+8%-7%	-15%	-15%-27%
Folato	-50%	-50%	+15%	+15%
Vitamina B ₁₂	-58%	-58%	0%	0%
Vitamina C	-33%	-33%	-7%	+87%
Vitamina D	—	—	0%	0%
Vitamina E	-47%	-20%	-13%	+30%
Minerales				
Calcio	-20%	-20%	-10%	-10%
Fósforo	-14%	—	-20%	—
Magnesio	-3%	+19%	+6%	+31%
Hierro	0%	-11%	+87%	+67%
Zinc*	+20%	+71%	0%	+57%
Yodo	0%	+15%	-20%	-8%
Flúor	0%	—	+2%	—
Cobre	+33%	—	-19%	—
Selenio	+27%	+106%	-13%	+41%

* Las recomendaciones son para los grupos de 19 a 30 y 31-50 años

Con relación a las vitaminas, las recomendaciones de México sólo están de acuerdo con las DRI ó con las de FAO/

OMS en vitamina B₁₂ y en Vitamina D (Tabla 5). Comparadas con las DRI-RDAs, las recomendaciones de México son menores en todas las demás instancias con excepción de la de folato (15% más altas). Por otra parte, al comparar con FAO-OMS, las recomendaciones de México son menores para tiamina, riboflavina, niacina y vitamina B₆ y mayores para vitamina A, folato, vitamina C y vitamina E. Tampoco existe una homologación con respecto a los nutrientes inorgánicos donde México recomienda consumos mayores de magnesio y de hierro que las DRI-RDAs y que FAO/OMS y menores de calcio y yodo. Por otra parte, las recomendaciones mexicanas de selenio son menores que DRI-RDAs y mayores que FAO/OMS y menores que DRI para fósforo y cobre, mientras que lo contrario ocurre para el flúor aunque con una diferencia pequeña. Por último, las cantidades recomendadas por FAO/OMS para zinc y selenio son considerablemente menores que las mexicanas. Lo que resulta obvio de la Tabla 4, y aún más acentuado en las comparaciones de diferencias porcentuales (Tabla 5), son las disparidades que existen entre las recomendaciones de EUA-Canadá y las de FAO/OMS. Con excepción de las recomendaciones de México –revisadas en el año 2004-, los demás documentos de Mesoamérica, incluyendo el de INCAP y el de Costa Rica, anteceden a las recomendaciones internacionales más conocidas de EUA-Canadá y FAO-OMS.

Razones teóricas para no uniformar los requerimientos de nutrientes en la región

Un aspecto importante y en ocasiones sutil en torno a estas consideraciones es reconocer que la relación de los "requerimientos de nutrientes" con "las recomendaciones de ingesta de nutrientes" no siempre es tan directa. En la medida en que las recomendaciones basadas en nutrientes se vean en términos de una ingesta mínima (ingesta segura), una ingesta ideal (recomendación) y una ingesta tope (nivel máximo tolerable), el intervalo entre el mínimo y el tope puede variar en amplitud aunque el nivel ideal se mantenga fijo. Existen bases de índole teórico y práctico para creer que se requieren recomendaciones nutricionales distintas para Mesoamérica, en comparación a otras regiones geográficas.

Genética y estructura de la población

La naturaleza demográfica de Mesoamérica es, en sí misma, variable. Su población original estaba constituida por indios americanos. Esta se unió en el período colonial con la influencia española. Los nativos africanos llevados a Cuba como esclavos se filtraron a las regiones costeras del Caribe, especialmente desde Guatemala hasta Panamá. Las migraciones subsecuentes de Europa y del Este de Asia han añadido una mayor diversidad étnica y genética en la región.

En la medida en que ciertas necesidades de micronutrientes puedan realmente determinarse por el peso

corporal total, las proporciones de masa magra o masa grasa, o la magnitud del gasto energético diario, es muy posible que se justifique una variación en la ingesta individual recomendable. El armonizar las recomendaciones con la salud pública de la población demanda necesariamente una descripción de las distribuciones de las características arriba mencionadas. Consideremos de qué forma el tamaño corporal puede ser un factor de variación en las necesidades de nutrimentos. Mientras que el hombre entre 19 y 30 años de EUA-Canadá presenta, en promedio, una estatura de 176 cm y un peso de 76 kg (3), en Mesoamérica observamos valores antropométricos que tienden a ser más bajos: El hombre rural promedio en Guatemala mide 160 cm y pesa 55 kg (18). En Panamá, los promedios respectivos para hombres adultos son 165 cm y 62 kg (19). En México, los hombres urbanos del Distrito Federal miden en promedio 166 cm de estatura y pesan 71 kg.; mientras que la región urbana del sureste, miden 164 cm y 70 kg, respectivamente (20), y en Mérida, una ciudad del estado de Yucatán, el hombre promedio mide 161 cm de estatura y pesa 68 kg (21). Por consiguiente, las necesidades de energía y de nutrimentos asociados con la ingesta energética podrían variar. Los factores genéticos justifican diferencias en las cantidades requeridas para cumplir con los procesos metabólicos y mantener reservas adecuadas de determinados nutrimentos. Aunque sin ignorar el impacto de las condiciones ambientales que rodean a diferentes grupos de población, claramente se han documentado diferencias étnicas en composición corporal (22,23). Los patrones de crecimiento en infantes y en niños pequeños, y la edad de inicio y la velocidad de crecimiento durante la pubertad difieren entre grupos raciales. La frecuencia de polimorfismos en genes que influyen el metabolismo de nutrimentos tales como el hierro y el ácido fólico difiere entre grupos étnicos (24). Se cree que la prevalencia del llamado "gen ahorrador" que regula el almacenamiento de energía dietaria ha sido condicionada, a lo largo de la evolución, por la experiencia de hambrunas intercurrentes y estilos de vida vigorosos. En la transición hacia una vida sedentaria asociada con una acumulación excesiva de grasa en la población con el gen ahorrador, es probable que los requerimientos de otros nutrimentos puedan sufrir alteraciones.

Disponibilidad de alimentos

Para que las recomendaciones sean válidas, es necesario que consideren los alimentos a los cuales la población recurrirá para cubrir sus necesidades nutricionales. Las matrices de

fuentes alimentarias de nutrimentos en la dieta pueden conducir a la interferencia (inhibición) o aumento (mejoría) de la eficiencia de la absorción intestinal de un nutrimento determinado. Las recomendaciones de nutrimentos deben establecerse a partir del conocimiento del sistema alimentario de un país.

En Mesoamérica, el uso de grasas agregadas a los alimentos (aceites, mantequillas, manteca, entre otros) es limitado. Al igual que en otros países en vías de desarrollo, las fuentes primarias de energía son los hidratos de carbono, simples y complejos (25). En la medida en que la ingesta de grasa es relativamente baja, la eficiencia en la absorción y en la asimilación de las vitaminas liposolubles está reducida. Por otra parte, en la medida en que el colon recibe una dotación importante de hidratos de carbono complejos, existe una utilización aumentada de riboflavina y por tanto, menores recomendaciones para su ingesta (26). La ingesta elevada de ácido fólico a partir de leguminosas y de cereales integrales, combinada con los taninos (polifenoles) en el café, conllevan a la inhibición de la absorción de hierro y de zinc (27,28). Uno podría estar en dos situaciones en las cuales el requerimiento para retener una cantidad determinada de un nutrimento es común, pero la disponibilidad biológica y/o la eficiencia de retención del nutrimento es muy diferente dependiendo de las circunstancias específicas. Por ejemplo, para el hierro, la dieta podría ser pobre en carne y rica en cereales integrales. Esto daría como consecuencia una baja biodisponibilidad del hierro donde se requeriría una gran cantidad de éste en la dieta —es decir una mayor recomendación— para permitir la absorción de cantidades suficientes del nutrimento.

Prácticas culturales

Al igual que el tamaño corporal puede influir en la utilización de la energía, las pretensiones económicas y los estilos de vida pueden también tener una influencia en este rubro. El supuesto gasto de energía del hombre típico de América del Norte (19 a 50 años de edad) en las recomendaciones diarias de nutrimentos (RDA) de Estados Unidos de 1989* y retomado en las nuevas DRI es de 2,900 kcal/día (3,8). Para los agricultores guatemaltecos, el gasto energético puede fluctuar entre 3,500 y 4,000 kcal/día. En climas fríos se requieren mayores cantidades de energía para el mantenimiento de la temperatura corporal, en comparación con los trópicos. Se requiere más energía para respirar y para las actividades respiratorias en altitudes con baja disponibilidad de oxígeno. Las poblaciones de Mesoamérica viven en altitudes que van desde el nivel del mar a 3000 metros.

Las actividades o prácticas al aire libre en el rubro de la construcción y de la agricultura que frecuentemente se dan en altas altitudes y latitudes tropicales, producen una abundante exposición al sol. En estos casos, la síntesis endógena

* En las Recomendaciones Diarias de Nutrimentos de 1989 (RDA) (8), el requerimiento promedio de energía para mujeres y hombres con actividad leve a moderada y entre 19 y 50 años de edad se estableció en 2,200 y 2,900 kcal por día, respectivamente.

de vitamina D es igualmente abundante. Con la persistencia de altas tasas de fertilidad en la región, se presentará una mayor acumulación de meses de gestación en la vida de una mujer y se experimentarán mayores consumos y pérdidas de nutrimentos debidas a los embarazos. Una pérdida de nutrimentos igualmente acentuada se experimentará con la acumulación de meses de lactancia y el mayor paso de nutrimentos al infante por vía de la leche materna.

La manera de preparar los alimentos es un condicionante importante de las recomendaciones nutricionales, si no es que de los requerimientos humanos. Los altos consumos de calcio a partir de tortillas de maíz nixtamalizado promueven la inhibición de la incorporación de hierro y de zinc (29,30). Otras prácticas culinarias de la región hacen a otros nutrimentos más (como por ejemplo el caso de la niacina y el triptofano) ó menos (como en el caso de la provitamina A) biodisponibles (31).

Estado de salud y medio ambiente

El Comité de Alimentación y Nutrición de los Estados Unidos (en inglés, Food and Nutrition Board) advierte que sus DRIs "sólo son aplicables a personas sanas". El mito de las personas "sanas", tal y como se entiende en países afluentes como Estados Unidos y Canadá, es uno de los principales obstáculos para la unificación de las recomendaciones a través de la región. La experiencia sanitaria y nutricional de la mayoría de la población mesoamericana no puede clasificarse como saludable y con frecuencia se presentan episodios de enfermedades respiratorias y de diarrea. Además, pueden presentar malaria, helmintos intestinales, filaria tisular ó duela (*Fasciola hepática*). Cuando la uncinariasis, la esquistosomiasis, ó ambas son endémicas, parte del hierro absorbido se desperdicia en sangrados de las vísceras y parte del hierro absorbido se pierde en sangrados en la cavidad abdominal. A fin de cuentas, uno recomendaría una mayor ingesta dietaria de hierro para mantener en el cuerpo la cantidad habitual. Por supuesto, el ejemplo de los parásitos que se alimentan de sangre se ilustra por el abismo que existe entre las realidades de los países ricos de las zonas templadas y las zonas tropicales pobres. Es probable que proporciones importantes de los habitantes de los países en desarrollo hayan presentado retardo en el crecimiento intrauterino y un pobre crecimiento en los primeros años de la vida debido a una inmunestimulación crónica ocasionada con el contacto con microbios en un medio ambiente contaminado (32). Esta situación aumenta la necesidad de nutrimentos para compensar por las pérdidas adicionales, por la absorción menos eficiente ó por la menor exposición para adaptarse a la agresión inmunológica (33).

Los países en desarrollo tienen determinados problemas endémicos de salud que condicionan la seguridad de la exposición a nutrimentos. La epidemia mundial de SIDA no ha

excluido a México y Centroamérica. Viene a la mente el caso de la ingesta de zinc en individuos seropositivos para VIH. Semba y Tang (34) encontraron que una mayor exposición a zinc, ya sea proveniente de la dieta o de suplementos, en el período inicial de la infección con VIH producía una progresión más rápida hacia el pleno establecimiento del SIDA y eventualmente a la muerte. Resulta obvio que las personas infectadas con el VIH no están sanas, pero tampoco se detectan fácilmente en la población general. Por lo mismo, hacer una recomendación en torno a la ingesta de zinc, sin tomar en consideración los posibles riesgos y beneficios de subsegmentos de población presenta retos técnicos y éticos.

Las agresiones impuestas por la desnutrición temprana, las parasitosis y las infecciones recurrentes pueden volverse universales en poblaciones poco privilegiadas. En estos casos, uno puede tomar la vía fácil y sugerir que no es posible aplicar ningunas recomendaciones debido a la baja frecuencia de personas sanas, ó uno puede aceptar el reto de formular requerimientos en el contexto de las condiciones nutricionales e higiénicas prevalentes en el medio. Cualquiera las recomendaciones existentes, es necesario hacer un alto en el camino y reflexionar acerca de en quienes se podrán aplicar. En los países en vías de desarrollo, los "sanos" son contados.

De recomendaciones basadas en nutrimentos a guías alimentarias

La aceptación de las recomendaciones basadas en nutrimentos de Estados Unidos y Canadá (DRI) y de FAO/OMS por la comunidad mundial de nutrición y los obstáculos hacia la armonización enfrentan otro tipo de consideraciones. En las últimas tres décadas, el paradigma en la manera en la cual la ingesta de alimentos interactúa con la condición del organismo ha cambiado. Hasta ese momento, obtener una cantidad correcta de nutrimentos — no demasiados pero, particularmente, no demasiado pocos — era el lema para todas las ramas de la nutrición; desde la correspondiente al estudio de los animales de laboratorio, a la relativa a los animales en las granjas hasta la nutrición humana.

Esta nueva corriente deriva de la crítica a las prácticas alimentarias en cuanto a que pueden condicionar la susceptibilidad de la población hacia las enfermedades crónicas (35). Sin embargo, una serie de observaciones epidemiológicas empezaron a ilustrar que el patrón de consumo de alimentos y bebidas, así como el contenido de constituyentes que no estaban actuando como nutrimentos (sino como agentes protectores o provocadores) eran determinantes poderosos de la salud cardiovascular (36) así como de los casos de neoplasias (37). En la disciplina conocida como "epidemiología nutricional" se han explorado las mejores combinaciones de alimentos y de grupos de alimentos que promueven la salud y evitan la enfermedad (38,39).

En Estados Unidos, la publicación de “Alimentos” (40) por parte del Departamento de Agricultura en 1979, y su “Guía Fácil de Alimentos para una Mejor Salud” fue el primer intento de abordar la relación del patrón alimentario con los aspectos preventivos del mantenimiento de la salud, el cual también constituyó, ese mismo año, el centro del Informe del “Cirujano General” sobre la Promoción de la Salud y la Prevención de la Enfermedad (41). Desde la publicación de sus primeras guías alimentarias en 1980, y a partir de entonces, cada cinco años, los Estados Unidos definen y actualizan sus Guías Alimentarias (42) a través de una serie de agencias federales. Después de este enfoque basado en la promoción de la salud y la prevención de la enfermedad, las Guías Alimentarias para Americanos de 1980, dictadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (en realidad, la primera orientación alimentaria para estadounidenses fue la escrita por W.O. Atwater en 1894, antes de la identificación de las vitaminas y los minerales) incluían 7 guías, en su mayoría con énfasis en que la población estadounidense incorporara variedad a sus patrones de alimentación, pero, al mismo tiempo, evitara algunos componentes individuales de los alimentos, en una connotación negativa: es decir: “evite azúcares y sodio”. Desde las Guías de 1980, el gobierno de Estados Unidos ha mantenido el énfasis en promover la variedad en la “dieta estadounidense” y, al mismo tiempo, ha evolucionado de mensajes restrictivos y negativos a mensajes más positivos, orientados a los alimentos (por ejemplo: “escoja sensatamente” en vez de “evite ciertos tipos específicos de alimentos”) en las Guías Alimentarias del año 2000 (43). En estas Guías del 2000, vigentes hasta el 2005, se incluye el “ABC” para los estadounidenses, por sus siglas en inglés; los conceptos fundamentales son “Aspira a una buena condición física, construye una base saludable y elige sensatamente” (43). Ante la confrontación con los cambios y la creciente globalización del abastecimiento alimentario en los Estados Unidos, las Guías Alimentarias de 2000 incluyeron también, por vez primera, el concepto de “Mantenga los alimentos seguros”. Las Guías Alimentarias de Estados Unidos se complementan con interpretaciones gráficas que han evolucionado desde versiones iniciales y los Cuatro Grupos Básicos de Alimentos, hasta la actual Pirámide de Alimentos del Departamento de Agricultura (44).

A nivel internacional, un Comité de Expertos de la OMS integró la información anterior en una reunión sobre “Preparación y Uso de Guías Alimentarias Basadas en Alimentos” que se llevó a cabo en Chipre en 1996 (45), las que han servido de base para la elaboración de las guías en diferentes países, incluyendo los de la región.

América Latina también ha tenido experiencia en la definición de “Guías Alimentarias”. Se ha dado un viraje a partir de abordar las enfermedades alimentarias por deficiencia como lo hizo Venezuela en los años ochenta, hacia abordar proble-

mas de ambos extremos del espectro, tanto el del déficit como el del exceso en las ingesta alimentaria que coexisten en la región de América Latina, particularmente en Mesoamérica. Son evidentes los contrastes y son el reflejo de las realidades nacionales. Así, en un extremo se encuentran países como Panamá, cuyo énfasis está en prevenir la enfermedades crónicas degenerativas y en el otro están países como Guatemala y Honduras, con un enfoque principal en el mejoramiento de la selección de alimentos para prevenir deficiencias en el consumo de alimentos en grandes segmentos de su población, al mismo tiempo que previenen desequilibrios debidos a excesos en el consumo de alimentos que, acompañados por cambios en el estilo de vida, ponen en riesgo de enfermedades crónicas como la hipertensión arterial, la obesidad, la diabetes y la enfermedad cardiovascular a otros grupos de población.

En tiempos recientes, la región mesoamericana se dio a la tarea de definir guías alimentarias bajo el liderazgo del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) junto con la publicación de las interpretaciones gráficas de los tipos de alimentos y la frecuencia de consumo para guiar a sus poblaciones a decidir intuitivamente qué tipos de alimentos han de llevar a la mesa familiar para llenas las recomendaciones nutricionales (16,46-48). Esta excepcional tarea ha obligado a los expertos profesionales y técnicos a ser innovadores y creativos, representando los grupos de alimentos en diversas formas y con distintas figuras, desde la adaptación de la pirámide de alimentos en Panamá (47), a los platos de Costa Rica (49) y de México (50) (Figuras 1 y 2) y la olla de la alimentación familiar en Guatemala (48) (Figura 3).

FIGURA 1
El plato del bien comer de México



FIGURA 2
El círculo de alimentos de Costa Rica



FIGURA 3
La olla de la alimentación familiar de Guatemala



Ni las recomendaciones nutricionales ni las guías dietéticas basadas en alimentos resultan ser autosuficientes para proporcionar lineamientos apropiados cuando se trata de aconsejar al público qué, cuándo y cuánto comer. En realidad, debe darse un proceso fluido dentro de un marco de referencia técnico armónico que resulte en recomendaciones nutricionales que se traduzcan a su vez, en las guías alimentarias y posteriormente se trasladen a representaciones gráficas. Un proceso más armónico requiere de la integración de los conceptos anteriores dentro de un enfoque culturalmente significativo.

La armonización interna: Cumplimiento simultáneo con las guías basadas en alimentos y las recomendaciones basadas en nutrientes

Claramente, las autoridades académicas y técnicas tienen dos intereses que servir. Uno es el interés tradicional de definir los intervalos seguros de ingestas de nutrientes seguros que garanticen un estado nutricional adecuado. El otro, es el interés emergente de establecer (o preservar) un patrón de se-

lección de alimentos que minimice el riesgo de enfermedades crónicas y que promueva la longevidad y el rendimiento físico y cognitivo a lo largo de la vida. ¿Pueden las distribuciones recomendadas en los esquemas de grupos de alimentos (íconos) proporcionar todo lo necesario para una adecuada ingesta de vitaminas y nutrientes inorgánicos? La armonización interna de las guías basadas en alimentos y las recomendaciones basadas en nutrientes surge muy por encima de ambos procesos para las naciones mesoamericanas.

CONCLUSIONES

Los nuevos esquemas de pensamiento con respecto a la producción de recomendaciones para la ingesta de nutrientes han avanzado más rápidamente en Estados Unidos y en Canadá y en la consulta de expertos convocada por las Naciones Unidas que en la región de Mesoamérica.

Las recomendaciones que se usan en Centroamérica anteceden los estándares actuales representados en los DRI (IDR) (9-12) y las recomendaciones de FAO/OMS (6). Por otra parte, México recién emitió sus nuevas recomendaciones, por lo que la ocasión es oportuna para reflexionar y actuar. Se hace aquí un llamado para la "armonización" de las recomendaciones basadas en nutrientes. La armonía involucra "acordes"; el término "unísono" involucra una melodía común. Creemos que es posible introducir una armonía a la región mesoamericana con ella misma y con el resto del mundo sin que necesariamente las recomendaciones presenten los valores numéricos exactos en concordancia con la región entera o con el mundo. Existen razones legítimas de índole biológica y antropológica basadas tanto en las poblaciones humanas como en el medio ambiente en Mesoamérica que condicionan demandas de nutrientes distintas, retenciones diferenciales de dichos nutrientes e interacciones entre nutrientes distintas (22-24, 29-33).

El área en la cual la armonización y el acoplamiento mutuo claramente se requieren es aquella entre las guías basadas en nutrientes y aquellas basadas en los patrones alimentarios y los lineamientos para el consumo. Los países en transición o en desarrollo de la región han empezado a madurar para la transición epidemiológica hacia las enfermedades crónicas (31). La existencia de emblemas ó íconos de guías alimentarias a lo largo de la región mesoamericana es testimonio de que las naciones están avanzando en la manera de propugnar un patrón alimentario que proteja la salud general en el largo plazo. Dichas dietas deben, al mismo tiempo, proporcionar los nutrientes necesarios para proveer una nutrición adecuada en los consumidores.

Sería imprudente que la comunidad de expertos en nutrición de las naciones mesoamericanas adoptara en su totalidad las recomendaciones de los grupos internacionales de expertos; sin embargo, tampoco puede darse el lujo de igno-

rarlas por completo y de producir su propio proceso regional, partiendo de cero. La comunicación permanente y el diálogo son las mejores instancias que pueden adoptarse en nuestras regiones. Es necesario que hablemos entre nosotros y con los autores y expertos que trabajan en el tópico común de las recomendaciones nutricionales y de las guías alimentarias en otras regiones. La urgencia no está en renovar rápidamente un perfil de recomendación que cubra todos los componentes esenciales y benéficos de la dieta mesoamericana, sino en reconocer que el proceso de revisión debe ser continuo y permanente por naturaleza y que debemos permanecer proactivamente interesados y comprometidos en poner los conocimientos más novedosos y certeros en el campo de las prácticas alimentarias a disposición y en beneficio de las poblaciones de las repúblicas de México y América Central.

REFERENCIAS

1. World factbook. www.odci.gov/cia/publications/factbook. (Consultado: June 24, 2004).
2. Bengoa J, Torun B, Behar M, Scrimshaw N. Metas nutricionales y guías de alimentación para América Latina. Bases para su desarrollo. Metas nutricionales y guías de alimentación para América Latina., Caracas, Venezuela, Arch Latinoamer Nutr. 1987;NUM: 373-426
3. Food and Nutrition Board. Subcommittees on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes and Upper Reference Levels of Nutrients Dietary Reference Intakes and Standing Committee of the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes: applications in dietary assessment. Washington D.C.: Institute of Medicine; 2000.
4. FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series No. 724. Geneva: WHO; 1985.
5. James WPT, Schofield EC. Human energy requirements. A manual for planners and nutritionists. Oxford: Oxford University Press; 1990.
6. FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. Preliminary report on recommended nutrient intakes. Revised July 13, 2000. www.fao.org/es/ESN/vitmi.pdf (Accessed: February 12, 2001).
7. FAO/WHO. Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand. FAO/WHO. Rome: Food and Nutrition Division, FAO; 2002. http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/004/Y2809E/y2809e00.htm (Accessed: June 30, 2004).
8. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. 10th. Ed. Washington, D.C.:National Academy Press; 1989.
9. Food and Nutrition Board, Standing Committee of the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington, DC: National Academy Press; 1999.
10. Food and Nutrition Board, Standing Committee of the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, DC: Institute of Medicine; 2000.
11. Food and Nutrition Board, Standing Committee of the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: Institute of Medicine; 2000.
12. Food and Nutrition Board, Standing Committee of the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, D.C.: Institute of Medicine, National Academy of Science; 2001.
13. Food and Nutrition Board, Standing Committee of the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, protein and amino acids (Macronutrients). Washington, D.C.: Institute of Medicine, National Academy of Science; 2002. 936 pp.
14. Food and Nutrition Board and Standing Committee of the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate. Washington, D.C., Institute of Medicine, National Academy of Science. 2004
15. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Organización Panamericana de la Salud, Editors. Recomendaciones Dietéticas Diarias del INCAP. Edición XLV Aniversario. Guatemala: INCAP; 1996.
16. Universidad de Costa Rica. Guías de alimentación: Lineamientos metodológicos y criterios técnicos. Costa Rica. Editoras: LM Muñoz y S Murillo González, Escuela de Nutrición, Universidad de Costa Rica y el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 1995:77 pag.
17. Bourges H, Casanueva E, Rosado JL (eds.) Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. I. Vitaminas y nutrimentos inorgánicos. México, Ed. Médica Panamericana, 2004 (en prensa).
18. Díaz E, Gonzalez-Cossio T, Rivera J, Immink MDC, Mendoza RD, Flores CR. Body composition estimates using different measurement techniques in a sample of highland subsistence farmers in Guatemala. Am J Human Biol. 1991; 3:525-530.
19. Bermúdez O, Parillon C, Valverde V, de Pinto A. Peso y talla en la población adulta panameña. Arch Latinoam Nutr 1984; 34(4): 605-14.
20. Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Dirección General de Epidemiología, SSA. México; 1993.
21. Vargas-Ancona L. Epidemiología de la diabetes mellitus, intolerancia a la glucosa y factores de riesgo aterogénico en Yucatán, México. Rev Biomed 1994;5:151-159
22. Wagner DR, Heyward VH. Measures of body composition in blacks and whites: a comparative review. Am J Clin Nutr 2000;71:1392-402.
23. Solomons NW, Kumanyika S. Implications of racial distinctions for body composition and its diagnostic assessment. Am J Clin Nutr 2000;71:1387-89.
24. Ashfield-Want PAL, Pullin CH, Whiting JM, Clark ZE, Mota S, Newcombe RG, Burr M, Lewis M, Powers HJ, McDowell

- IFW. Methylene tetrahydrofolate reductase 677C-T genotype modules homocysteine response to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2002;76:180-6.
25. Drenowski A, Popkin BM. The nutrition transition: new trends in the global diet. *Nutr Rev* 1997;55:31-43.
 26. Boisvert WA, Mendoza I, Castañeda C, Portocarrero L, Solomons NW, Gershoff SN, Russell RM. Riboflavin requirement of healthy elderly and its relationship to macronutrient composition of the diet. *J Nutr* 1993;123:915-925.
 27. Solomons NW. Dietary sources of zinc and factors affecting its bioavailability. *Food Nutr Bull* 2001;22:138-154.
 28. Yip R. Iron. In: Bowman BA, Russell RM (eds) *Present Knowledge in Nutrition*. 8th Edition. Washington, D.C., ILSI Press 2001:311-328.
 29. Hallberg, L., Brune, M., Erlandsson, M., Sandberg, A.S., Rossander-Hulten, L. (1991) Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 53: 112-119.
 30. Cañillo-Durán C, Solomons NW. Studies on the bioavailability of zinc in humans. IX. Interaction of beef-zinc with iron, calcium and lactose. *Nutr Res* 1991;11:429-438.
 31. Valdés-Ramos R, Solomons NW. Preventive nutrition: Its changing context in MesoAmerica. *Nutr Res* 2002;22:145-52.
 32. Solomons NW, Mazariegos M, Brown KH, Klasing K. The underprivileged, developing country child: Environmental contamination and growth revisited. *Nutr Rev* 1993; 51:327-332.
 33. Solomons NW. Biological, ecological and social origins of trace element deficiencies in developing countries. In: Wahlqvist ML, Truswell AS, Smith R, Nestel PJ (eds). *Nutrition in a sustainable environment*. Proceedings of the 16th International Congress on Nutrition. London, Smith-Gordon 1994:299-302.
 34. Semba RD, Tang AM. Micronutrients and the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Brit J Nutr* 1999;81:181-185.
 35. Fidanza F, Puddu V, Imbimbo AB, Menotti A, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. VII. Five-year experience in rural Italy. *Circulation* 1970;41 (Suppl 4):163-75.
 36. Willett WC. Diet and coronary heart disease. In: Fitzpatrick, JE Anderson, L'Abbe ML (eds) *From nutritional science to nutrition practice for better global health*. 16th International Congress of Nutrition. Ottawa, Canadian Federation of Biological Societies 1998:1-3.
 37. Peto R. Cancer, cholesterol, carotene, and tocopherol. *Lancet*. 1981 Jul 11;2(8237):97-8.
 38. Willett WC. *Nutritional epidemiology*, 2nd Edition. New York, Oxford University Press, 1999.
 39. Margetts B, Nelson M. *Design concepts in nutritional epidemiology*, 2nd Edition. Oxford, Oxford University Press, 1997.
 40. U.S. Department of Agriculture, Science and Education Administration. *Food, Home and Garden Bulletin No. 228*, 64 pp., 1979.
 41. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. *Healthy People: The Surgeon General's Report on Health Promotion and Disease Prevention*. DHEW (PHS) Publication No. 79-55071, 1979.
 42. U.S. Department of Agriculture, Dietary Guidelines Advisory Committee. *Dietary Guidelines for Americans, 1980 to 2000*. Department of Agriculture, US Department of Health. 2001 En: www.usda.gov/cnpp/Pubs/DG2000/Dgover.PDF. (Consultado Noviembre 26, 2001)
 43. U.S. Department of Agriculture, Dietary Guidelines Advisory Committee. *Dietary Guidelines for Americans 2000*, 5th Edition. Department of Agriculture, US Department of Health. 2000 En: www.usda.gov/cnpp/DietGd.pdf. (Consultado Noviembre 26, 2001)
 44. U.S. Department of Agriculture. *The Food Guide Pyramid*. Home and Garden Bulletin No. 252: Human Nutrition Information Service; 1992.
 45. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Preparation and use of food-based dietary guidelines*. Report of a joint FAO/WHO consultation Nicosia, Cyprus. WHO/NUT/96.6. Nicosia, Cyprus: WHO, FAO; 1996.
 46. Molina V. *Guías alimentarias y promoción de la salud en América Latina*. Guatemala: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá; 2000.
 47. Ministerio de Salud de Panamá. 1995. *Guías alimentarias para Panamá*. Ciudad de Panamá, Panamá, Ministerio de Salud. 40 pag.
 48. Comisión Nacional de Guías Alimentarias de Guatemala. *Guías alimentarias para Guatemala: Los siete pasos para una alimentación sana*. Guatemala, Comisión Nacional de Guías Alimentarias; 1988 44 pag.
 49. Ministerio de Salud de Costa Rica. *Guías Alimentarias para la educación nutricional in Costa Rica*. Costa Rica., Ministerio de Salud, Instituto de Seguridad Social, Ministerio de Educación y el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 1997: 90 pag.
 50. Secretaría de Salud. *Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-043-SSA2-1999*, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. *Diario Oficial*. Diciembre 24, 2001: 54-71.

Recibido: 07-07-2003

Aceptado: 07-12-2004

Efectividad de un programa nacional de fomento de la lactancia materna en Chile 1993-2002

Eduardo Atalah S., Cecilia Castillo L., Cecilia Reyes A.

Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

RESUMEN. El fomento de la lactancia materna ha sido una prioridad del Ministerio de Salud en la última década. El objetivo del estudio fue evaluar la tendencia de la lactancia materna en menores de 18 meses, controlados en el sistema público de salud, según los resultados de cuatro encuestas nacionales. Por una entrevista estructurada se exploró cada 3 años la alimentación del día anterior (pecho, agua, jugos, fórmulas, alimentos sólidos) y la participación materna en trabajos fuera del hogar, en una muestra aleatoria de ~ 10 mil niños en los 28 servicios de salud del país. Se determinó la prevalencia de lactancia materna exclusiva, predominante (pecho, agua o jugo), complementada (pecho más sólidos) u otras formas de alimentación por mes de edad y los cambios en el período estudiado. Entre 1993 y 2002 la lactancia exclusiva al sexto mes aumentó de 16,0 a 43,1% ($p < 0,001$) y la predominante de 25,4 a 57,4% ($p < 0,001$). En el mismo período aumentó la lactancia complementada a los 12 meses de 10,7 a 21,3% ($p < 0,001$) y la lactancia parcial o complementada en niños de 12 a 18 meses de 24,1 a 46,7%. El trabajo materno fuera del hogar se asoció inversamente con la prevalencia de lactancia exclusiva y complementada durante el primer año ($p < 0,001$). Se concluye que ha habido un aumento significativo de la lactancia materna en el período analizado. El negativo efecto del trabajo materno sobre la lactancia sugiere explorar formas más efectivas de apoyo social a las madres trabajadoras.

Palabras clave: Lactancia materna exclusiva, lactancia materna complementada, prevalencia, tendencia, Chile.

SUMMARY. Efficacy of a national program to promote breast feeding: Chile 1993-2002. Promotion of breast feeding is a priority in Chilean health's policies. The aim of the study was to evaluate the tendency of breastfeeding (exclusive, continued, partial), in children less than 18 months old, controlled in the Chilean public health system, based in four national surveys. Through a 24 h food intake recall (breastfeeding, water, juice, infant formula, solids) food patterns were explored every 3 years, as well as maternal participation in jobs located away from home. The sample consisted of ~ 10 thousand children, less than 18 months old of the 28 health services throughout the country. The prevalence of children with exclusive breastfeeding, predominant (breastfeeding, water or juice), complemented (breastfeeding plus solids) or any other way of feeding for each month of age in each survey, and changes in period studied, was determined. Between 1993 and 2002, exclusive breastfeeding for 6 months increased from 16 to 43.1% ($p < 0.001$) and predominant breastfeeding from 25.4 to 57.4%. At the same time, complemented breastfeeding at 12 months increased from 10.7 to 21.3%, and partial or complemented breastfeeding in 12 to 18 month old children went from 24.1 to 46.7%. Maternal work located away from home was inversely associated with the prevalence of exclusive and complemented breastfeeding during the first year ($p < 0.001$). There has been a significant increase of maternal breastfeeding in the period analyzed. The negative effects of maternal labor on breastfeeding suggests to explore more effective forms of social support to the working mother.

Key words: Exclusive breastfeeding, complemented breastfeeding, prevalence, tendency, Chile.

INTRODUCCION

Numerosas son las ventajas descritas en relación a la lactancia materna tanto para el niño como para la madre, familia, el medio ambiente y la sociedad en su conjunto. Considerando todos estos aspectos, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda como alimentación ideal la lactancia materna en forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida y complementada con alimentos sólidos a partir de esta edad y durante los dos primeros años de vida (1-3).

Chile ha firmado una serie de convenios internacionales que privilegian el desarrollo de actividades para mejorar la salud infantil, entre ellas, la Declaración de Innocenti, en 1990,

para la promoción y apoyo de la lactancia materna (4). Las "Metas y líneas de acción en favor de la infancia" que se elaboraron en 1992 proponían lograr a fines del decenio un 80% de lactancia exclusiva a los cuatro meses de vida del niño y un 35% de lactancia complementada al año de edad (5).

En Chile a fines de la década del 70 el porcentaje de niños con lactancia exclusiva al sexto mes de vida no superaba el 5%, cifras que mejoraron significativamente entre 1979 y 1982 con la realización de una campaña impulsada por el Ministerio de Salud (MINSAL) (6). Una vez concluida la campaña, las cifras de lactancia materna declinaron nuevamente en forma importante, demostrando la necesidad de desarrollar actividades que se mantuvieran en el tiempo.

A partir de los años 90 Chile ha realizado una serie de esfuerzos en relación al fomento de la lactancia materna. Entre ellas destaca, la reorganización de la Comisión Nacional de Lactancia Materna, la adopción de la iniciativa de "Hospitales amigos de la madre y del niño", la elaboración de un Manual de Lactancia Materna, material educativo impreso y filmado, una mayor preocupación por la aplicación del Código Internacional de Comercialización de los Sucedáneos de la leche materna, la modificación de las normas de alimentación infantil en atención primaria, el fortalecimiento de los programas de estudio de pregrado y post grado de los profesionales de la salud y la capacitación de los equipos de salud con conceptos actualizados sobre lactancia materna (7-15). Se adaptaron los 10 pasos para Consultorios y Jardines Infantiles, creándose modelos para su evaluación y acreditación, siguiendo las pautas internacionales establecidas para los hospitales.

Para determinar la situación inicial respecto a lactancia materna y monitorear su evolución con las futuras intervenciones, el Ministerio de Salud planificó y realizó una primera encuesta nacional el año 1993. La información se obtuvo de una muestra representativa de casi 10 mil niños controlados en los consultorios de atención primaria de los 26 servicios de salud que existían en el país. Esta encuesta mostró una prevalencia de lactancia materna exclusiva de 54 y 16% al tercer y sexto mes de edad respectivamente y un 10% con lactancia complementada a los 12 meses (16). La misma metodología se utilizó en las encuestas nacionales que se repitieron los años 1996 (17), 2000 y 2002, datos que permiten analizar las tendencias en la alimentación que reciben los niños controlados en el sector público de salud, lo que constituye el objetivo de esta publicación.

MATERIAL Y METODOS

En 1993 se diseñó un estudio de prevalencia considerando como universo a los niños menores de 18 meses controlados en los establecimientos urbanos del nivel primario de atención de los 26 servicios de salud existentes a la fecha en el país. El sistema público de salud controla aproximadamente al 65% de la población nacional, que mayoritariamente corresponde a familias de nivel socio económico medio bajo y bajo (primeros tres quintiles de ingreso). La escolaridad promedio de las madres es de 8 a 9 años, aunque como muchos otros indicadores sociales existen diferencias entre los servicios de salud.

La estimación del tamaño de muestra se realizó considerando 25% de lactancia exclusiva a los seis meses, nivel de confianza 95%, error de estimación 2,5% en cada grupo de edad, no respuesta o respuesta incompleta 10% y efecto de diseño de 1,5. Se definió de esta forma un tamaño muestral de 9.912 niños (18). Ese año existían en el sistema público de

salud alrededor de 300 consultorios urbanos, de los cuales fueron seleccionados aleatoriamente el 25% (2 a 4 en cada servicio de salud). El tamaño de muestra para cada centro de salud se estableció en forma proporcional a la población bajo control. La encuesta fue aplicada por profesionales del mismo establecimiento (Enfermeras, Nutricionistas), quienes recibieron una instrucción personal y por escrito sobre los criterios de selección de la muestra y la forma de recoger la información. La encuesta fue aplicada a todos los niños menores de 19 meses que asistieron a control de salud, por vacunación o por morbilidad en un período determinado hasta completar el tamaño de muestra establecido.

La información alimentaria fue obtenida directamente de la madre o cuidadora del niño a través de una encuesta de recordatorio del día anterior previamente validada (16). Se exploró el consumo el día anterior de los siguientes alimentos: leche materna, fórmulas lácteas, agua, jugos u otros líquidos, papillas o alimentos sólidos. Para cada variable se definieron sólo dos opciones (consume, no consume) sin considerar el volumen recibido. De acuerdo al tipo de alimentación recibida se establecieron las siguientes categorías:

- Lactancia materna exclusiva: consumo exclusivo de leche materna; no se considera el agregado de ningún otro líquido o sólido, salvo vitaminas, minerales (gotas o jarabes) o medicamentos;
- Lactancia materna predominante: leche materna como fuente de alimentación, más líquidos como jugo o agua;
- Lactancia materna complementada: leche materna más alimentos no lácteos (sólidos o semi sólidos);
- Lactancia parcial: leche materna más fórmulas lácteas en cualquier proporción o lactancia materna más fórmula más sólidos;
- Fórmula exclusiva.
- Fórmula más sólidos

En 1996 (17), 2000 y 2002 se repitieron las encuestas utilizando los mismos criterios anteriores, ampliándose la muestra a los 28 Servicios de Salud actualmente existentes y considerando además una muestra de consultorios rurales proporcional a la población atendida en estos centros de salud (aproximadamente 18% en el ámbito nacional). Se incluyó además una pregunta sobre trabajo materno fuera del hogar, para determinar la importancia de esta variable en las prácticas de lactancia.

Para el procesamiento de cada encuesta se utilizaron planillas electrónicas, las que fueron analizadas con el programa STATA 6.0 (19). Posteriormente se creó una base de datos con el total de registros existentes. Para el análisis estadístico se usó prueba de χ^2 y análisis de varianza considerándose diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

La muestra estudiada en cada uno de los períodos, se muestra en la Tabla 1. En cada encuesta se incluyeron alrededor de 10.000 niños, cifra superior al 95% de la muestra previamente planificada, con una mayor proporción de menores de 6 meses, que representan cerca del 50% del total.

TABLA 1
Distribución de la muestra por año y grupo de edad

Edad meses	1993	1996	2000	2002
0 - 2	2346	3061	3013	2956
3 - 5	1942	2195	2311	2367
6 - 8	1627	1707	1650	1771
9 - 11	1384	1183	1323	1087
12 - 14	884	1153	1279	1084
15 - 18	1138	1158	1020	991
Total	9321	10457	10596	10256

La prevalencia de lactancia materna exclusiva y predominante el primer semestre de vida se presenta en la Tabla 2. Cerca del 80% de los niños recibe pecho exclusivo el primer mes de vida, proporción que no se ha modificado mayormente durante estos 10 años. El año 93 el porcentaje de niños con lactancia exclusiva declinaba en forma importante alcanzando sólo a 16% al 6° mes de vida. En las encuestas posteriores esta proporción ha aumentado en forma significativa, especialmente durante el segundo trimestre, alcanzándose el año 2002 una prevalencia al 6° mes de 43,1%, cifra 2,6 veces mayor que el 93 ($p < 0,001$). Esta tendencia positiva se ha estabilizado y mostrado algunos retrocesos entre el 2000 y 2002. Un análisis similar pero incluyendo además a los niños que reciben lactancia predominante (pecho materno y agua o jugos) muestra la misma tendencia anterior, pero con cifras 10 a 15% superiores, que corresponde a la proporción de madres que reconocen darle agua o jugo al niño, además del pecho. Es importante destacar que el 57% de los niños recibe una lactancia predominante al 6° mes de vida, proporción muy superior a la observada en la mayoría de los países de Latinoamérica.

La lactancia materna adecuadamente complementada (adición de alimentos semi sólidos o sólidos a partir de los 6 meses) también ha tenido una evolución positiva (Tabla 3), aumentado cerca de 10% entre 1993 y 2002. A diferencia de la lactancia exclusiva se ha mantenido una leve mejoría, en cada uno de los períodos estudiados ($p < 0,001$).

TABLA 2
Prevalencia de lactancia materna exclusiva y predominante en menores de 6 meses 1993-2002

Edad días	Lactancia Materna Exclusiva				LME + Lactancia predominante ¹			
	1993 %	1996 %	2000 %	2002 %	1993 %	1996 %	2000 %	2002 %
0- 29	78,8	78,5	83,8	83,0 *	86,7	87,2	89,7	89,9 *
30-59	67,6	66,4	73,7	74,3 *	77,0	76,2	81,8	83,9 *
60-89	54,0	57,4	67,4	65,4 *	66,7	72,0	77,7	75,4 *
90-119	46,4	45,0	60,0	55,0 *	59,4	61,9	69,2	66,3 *
120-149	31,0	41,0	51,0	50,6 *	43,2	57,5	62,7	65,1 *
150-179	16,0	30,4	39,5	43,1 *	25,4	45,3	51,7	57,4 *
Total	50,7	56,0	64,4	63,2 *	61,6	69,1	73,8	74,2 *

¹LME = Lactancia Materna Exclusiva; Lactancia predominante: lactancia materna como único alimento más agua o jugo.

* $p < 0,002$

TABLA 3
Prevalencia de lactancia materna complementada en niños de 6 a 11 meses 1993- 2002

Edad Meses	1993 %	1996 %	2000 %	2002 %	p
6,0 a 6,9*	31,6	39,2	42,4	42,9	< 0,001
7,0 a 7,9	27,1	31,4	30,3	34,4	N.S.
8,0 a 8,9	23,5	30,2	28,8	31,1	< 0,05
9,0 a 9,9	19,5	21,2	24,5	25,9	N.S.
10,0 a 10,9	14,0	20,4	20,4	24,2	< 0,005
11,0 a 11,9	10,7	11,9	16,3	21,3	< 0,001
Total	22,5	28,6	29,7	32,9	< 0,001

* A los 6 meses se incluye también lactancia materna exclusiva.

La prevalencia de lactancia, en cualquiera de sus formas, se presenta en la Tabla 4. Más del 95% de las madres alimenta con pecho a sus hijos el primer trimestre de vida, proporción que va declinando, pero que alcanza casi al 50% a los 18 meses de edad. Nuevamente la tendencia ha sido ascendente, con un incremento de aproximadamente 12% entre los 6 y 8 meses y superior al 20% en edades posteriores ($p < 0,001$).

El trabajo materno fuera del hogar es un factor determinante en la duración de la lactancia materna exclusiva. El análisis conjunto de las últimas 3 encuestas muestra que la prevalencia de lactancia exclusiva al 5° y 6° mes es la mitad en este grupo con relación a las mujeres que permanecen en sus hogares (Tabla 5). Algo similar ocurre con la lactancia materna complementada, con casi 20% puntos de diferencia porcentual entre ambos grupos ($p < 0,001$).

TABLA 4
Prevalencia de lactancia materna según grupo de edad
1993-2002 *

Edad meses	1993 %	1996 %	2000 %	2002 %	p
0,0 a 2,9	93,1	96,3	96,6	96,5	< 0,001
3,0 a 5,9	73,0	82,0	84,9	87,1	< 0,001
6,0 a 8,9	57,0	65,4	66,8	69,0	< 0,001
9,0 a 11,9	41,6	55,6	59,9	64,0	< 0,001
12,0 a 18,0	24,1	40,5	46,0	46,7	< 0,001
Total	61,6	72,5	75,3	77,0	< 0,001

* Incluye todas las formas de lactancia: lactancia exclusiva, predominante, complementada y lactancia parcial (agregado de fórmulas lácteas).

TABLA 5
Lactancia materna exclusiva y complementada según tipo
de trabajo materno, 1996-2002

Lactancia mes	Trabajo materno fuera del hogar %	Trabajo materno dentro del hogar %	p
Exclusiva			
Cuarto	37,7	57,7	< 0,001
Quinto	25,9	53,0	< 0,001
Sexto	17,3	42,5	< 0,001
Complementada			
Octavo	16,1	36,2	< 0,001
Noveno	13,3	34,2	< 0,001
Duodécimo	9,7	18,4	< 0,001

DISCUSION

Un tema importante a resolver en este estudio es la confiabilidad de la información. ¿Es suficiente una encuesta de recordatorio del día anterior para definir la alimentación habitual? ¿Existe la posibilidad de que las respuestas estén sesgadas o se modifiquen porque es el propio personal de salud el que realiza la encuesta? No es fácil responder a estas preguntas pero en nuestra opinión la encuesta entrega una información razonablemente satisfactoria según los resultados de un estudio previo (20). En una muestra de 519 niños comparamos las respuestas de una encuesta de recordatorio del día anterior con el registro de la ficha clínica obtenido con una diferencia inferior a 7 días. Los resultados demostraron una concordancia de 93,4% para lactancia materna exclusiva y un poco menor para otras alternativas de alimentación. Aunque el estudio fue realizado en un solo Servicio de Salud sus resultados nos permiten aceptar con mayor seguridad los

datos de las encuestas nacionales.

Por otra parte, asumiendo que hubiera algún margen de error en la información obtenida en las encuestas, no existen argumentos para pensar que la magnitud o la dirección del error se haya modificado, considerando que se usó la misma metodología. De este modo los datos nos permiten analizar tendencias, aún cuando hubiera algunas diferencias con la prevalencia "real" de lactancia existente.

Numerosos estudios han demostrado fuera de toda discusión las bondades de una educación cara a cara para fomentar la duración de la lactancia materna exclusiva (21-25). En una revisión de 19 estudios realizados en la década de los 90 en los 5 continentes, se encontró un efecto positivo en 18 de ellos, con una diferencia en la prevalencia de lactancia exclusiva a los 5-6 meses 30 a 40 puntos porcentuales superior en el grupo intervenido con relación al grupo control (25). La revisión, que incluyó 4 estudios chilenos (11-14), concluye que existe una dosis respuesta con relación al número de actividades educativas realizadas y que se obtiene un mejor resultado cuando se realizan actividades educativas tanto en el hospital como en la comunidad. Aunque los resultados son muy consistentes, la principal crítica a esta revisión es el tamaño de muestra de cada estudio, que en varios es inferior a 100 casos y en casi todos inferior a 500. Una nueva interrogante es si se pueden lograr los mismos resultados a escala regional o nacional.

La experiencia chilena demostraría que sí es posible lograr resultados positivos en el ámbito nacional. Durante el período estudiado aumentó la lactancia exclusiva en 27 puntos porcentuales al 6º mes y en una cifra algo superior la lactancia predominante. También aumentó en 10 y 22 puntos la proporción de mujeres con lactancia complementada al año de edad y con lactancia a los 18 meses, respectivamente. Numerosos hechos pueden haber contribuido a estos buenos resultados, entre los cuales se puede destacar la iniciativa Hospitales Amigos de la Madre y del Niño, capacitaciones al equipo de salud a nivel nacional, revisión y adecuación de las normas ministeriales de alimentación del niño menor de 2 años, mayor énfasis sobre la lactancia materna en la formación de los profesionales de la salud y el monitoreo del código de comercialización de los sucedáneos de la leche materna.

¿Es posible replicar esta exitosa experiencia en otros países?, ¿Cuál ha sido el factor diferencial, considerando que muchos países han usado una estrategia similar? Nuevamente es difícil entregar una respuesta, pero es probable que parte del éxito puede ser atribuido a la alta cobertura y concentración de actividades en atención primaria que ha logrado el país. El sistema nacional de Servicios de Salud cubre a más del 95% de las personas de los tres primeros quintiles de ingreso, con controles prenatales precoces y con 99,5% de atención profesional del parto. Prácticamente todos los recién nacidos se controlan antes de los 10 días y existen controles de salud

frecuentes durante el primer semestre de vida, donde se enfatiza en forma especial la alimentación y la promoción de la lactancia materna. Existen normas ministeriales que se conocen, se discuten y se aplican con criterio profesional. Se han realizado estas cuatro encuestas nacionales de lactancia materna orientadas a determinar la línea base y/o establecer si se avanza en la dirección correcta. Es probable que sin este conjunto de elementos sea muy difícil replicar los resultados. La importancia de un sistema de salud con estas características se ve reforzada por el análisis de los datos de lactancia en forma desagregada, que no muestra grandes variaciones entre los servicios de salud, así como indicadores de salud materno infantil.

Es importante destacar que las encuestas se han realizado exclusivamente en la población que se atiende en el sistema público de salud. Una gran interrogante es conocer la situación del 35% restante, que se controla en el sistema privado de salud. Nuestra impresión es que también ha habido un importante aumento de la lactancia en este grupo, aunque no está documentada. Una encuesta similar en una muestra de profesionales que atienden en el sistema privado podría dar la respuesta.

Los datos muestran que el trabajo de la madre fuera del hogar fue un factor determinante en la duración de la lactancia exclusiva y complementada. Cualquier futuro progreso debiera pasar por una respuesta más adecuada para el 25-30% de las mujeres chilenas que están en esa condición. Varias propuestas se han realizado en los últimos años para modificar la legislación vigente, que limita el descanso post natal a 84 días. Aún cuando existe la obligación de disponer salas cunas para las madre que trabajan o darle facilidades para alimentar al pecho a su hijo, estas medidas no serían suficientes. La ampliación del descanso post natal es probablemente una medida costo-efectiva para incentivar la lactancia exclusiva, mejorar el crecimiento y desarrollo infantil y reducir la morbilidad en esta etapa de alta vulnerabilidad.

Finalmente es importante señalar que en los dos últimos años se han estabilizado algunos de los indicadores estudiados e incluso ha habido pequeños retrocesos. Este hecho es preocupante, considerando el nuevo perfil epidemiológico de los niños en Chile que se caracteriza por cifras importantes de sobrepeso, obesidad y otras enfermedades crónicas y las evidencias científicas relacionadas con el efecto protector y preventivo de la lactancia materna (26-30). Ello reafirma la importancia de mantener activa la estrategia desarrollada en forma tan exitosa, especialmente, la capacitación permanente del personal de salud, el control de salud y el monitoreo de las estrategias de comercialización de los alimentos sucedáneos, ya que diversas experiencias demuestran que se pueden perder los logros alcanzados cuando se concluye una intervención y no se implementan medidas para asegurar su sostenibilidad (6,12,21).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa participación de todas las madres que fueron entrevistadas y al personal de salud que con entusiasmo y responsabilidad realizó las encuestas a través de todo el país.

REFERENCIAS

1. WHO. Implementing the Global Strategy for Infant and Young Child Feeding: Report of a technical meeting. Geneva, 2003.
2. WHO. Community-based strategies for breastfeeding promotion and support in developing countries, Geneva, 2003.
3. WHO. Complementary feeding: Report of the Global Consultation, and Summary of Guiding Principles for complementary feeding of the breastfed child, Geneva, 2001.
4. OMS/UNICEF. La lactancia en el decenio 1990: una iniciativa a nivel mundial, Innocenti, Italia, 1990.
5. República de Chile. Metas y líneas de acción en favor de la infancia. Compromisos con los niños de Chile para la década. Santiago, Chile 1992.
6. González N, Hertrampf E, Mardones F, Rosso P, Verdugo C. Evaluación preliminar del impacto del programa de fomento de la lactancia materna. Rev Chil Pediatr 1983; 54: 36-40 Printer, 1995 Santiago, Chile.
7. República de Chile. Ministerio de Salud. Lactancia Materna: Contenido Técnico para profesionales de la salud. Editorial Printer, 1995 Santiago, Chile.
8. República de Chile. Ministerio de Salud, UNICEF, Comisión Nacional de Lactancia Materna, Informe de actividades 1992 - 1995, Santiago, Chile.
9. Ossandón M, Ilabaca J, Gajardo C, Castillo N, Namur L. Fomento de lactancia materna, programa Iniciativa, Hospital amigo del Niño y de la Madre, en el Hospital Barros Luco Trudeau Rev Chil Pediatr 2000; 71: 98 - 106.
10. Atalah E, Castillo C. Crecimiento del menor de un año con lactancia exclusiva en relación a la referencia OMS 1994. Arch Latinoamer Nutr 1997; 47: 29-33.
11. Alvarado R, Atalah E, Díaz S, Riveros S, Labbé M y Escudero Y. Evaluation of breast feeding supporting program with health promoters participation. Food and Nutrition Bulletin 1996; 17: 49-53.
12. Pérez A, Valdés V. Santiago breastfeeding promotion program: preliminary results of an intervention study. Am J Obstet Gynecol 1991; 165 (6 Pt): 2039-2044.
13. Valdés V, Pérez A, Labbok M, Pugin E, Zambrano I, Catalán S. The impact of a hospital and clinic-based breastfeeding promotion programme in a middle class urban environment. J Trop Pediatr 1993; 39 (3):142-151.
14. Burkhalter BR, Marín OS. A demonstration of increased exclusive breastfeeding in Chile. Int J Gynecol Obstet 1991; 34 (4): 353-359.
15. Ilabaca J, Atalah E. Tendencia de la lactancia materna en el Servicio de Salud Metropolitano Sur. Rev Chil Pediatr 2002; 73: 127-134.
16. Castillo C, Atalah E, Riumalló, Castro R. Breast-feeding and nutritional status of nursing children in Chile. Bulletin of PAHO

- 1996; 30: 125-133.
17. Ministerio de Salud, Comisión Nacional de Lactancia Materna. Encuesta Nacional de Lactancia 1996 . Ord. 4C/ 315 Enero de 1998. Subsecretaría de Salud, Santiago 1998.
 18. Snedecor G. and Cochran W. Statistical methods. The Iowa State University Press, 6th Ed. Ames, Iowa, 1972.
 19. StataCorp. 1999. Stata Statistical Software: release 6.0. College Station, Texas: Stata Corporation.
 20. Ilabaca J, Atalah E. Comparación de la prevalencia y porcentaje de acuerdo entre dos métodos de análisis de la lactancia materna. *Rev Chil Pediatr* 2002; 73: 583-589.
 21. Lutter CK. Breastfeeding promotion—is its effectiveness supported by scientific evidence and global changes in breastfeeding behaviors? *Adv Exp Med Biol.* 2000;478:355.
 22. Haque MF, Hussain M, Sarkar A, Hoque MM, Ara FA, Sultana S. Breast-feeding counseling and its effect on the prevalence of exclusive breast-feeding. *J Health Popul Nutr.* 2002; 20: 312-6.
 23. Lutter CK, Perez-Escamilla R, Segall A, Sanghvi T, Teruya K, Wickham C. The effectiveness of a hospital-based program to promote exclusive breast-feeding among low-income women in Brazil. *Am J Public Health.* 1997;87 : 659-63.
 24. Akram DS, Agboatwalla M, Shamshad S. Effect of intervention on promotion of exclusive breast feeding. *J Pak Med Assoc.* 1997; 47: 46-8.
 25. Albernaz E, Victora CG. Impact of face-to-face counseling on duration of exclusive breast-feeding: a review. *Rev Panam Salud Publica.* 2003; 14: 17-24.
 26. Grummer-Strawn LM, Mei Z. Does breastfeeding protect against pediatric overweight? Analysis of longitudinal data from the Centers for Disease Control and Prevention Pediatric Nutrition Surveillance System. *Pediatrics.* 2004 ; 113: 81-6.
 27. Victora CG, Barros F, Lima RC, Horta BL, Wells J. Anthropometry and body composition of 18 year old men according to duration of breast feeding: birth cohort study from Brazil. *BMJ.* 2003 18; 327 : 901.
 28. Parsons TJ, Power C, Manor O. Infant feeding and obesity through the lifecourse. *Arch Dis Child.* 2003; 88: 793-4.
 29. Martin RM, Ness AR, Gunnell D, Emmett P, Davey Smith G; ALSPAC Study Team. Does breast-feeding in infancy lower blood pressure in childhood? The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Circulation.* 2004 16; 109: 1259-66.
 30. Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics.* 2002; 110: 597-608.

Recibido:24-09-2004

Aceptado: 29-12-2004

El té verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares?

Tania T. Hernández Figueroa, Elena Rodríguez-Rodríguez, Francisco J. Sánchez-Muniz

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid. Madrid (España)

RESUMEN. El té (*Camellia sinensis*) ha sido usado durante siglos como bebida medicinal y es consumido por cerca de dos tercios de la población mundial diariamente. Es originario del sur de China y es cultivado extensamente en Asia y en los países de África central. Los tres principales tipos de son: negro, oolong y verde. El té verde es una bebida no fermentada y su consumo es habitual en los países asiáticos. Este último se produce a partir de las hojas frescas de la planta *Camellia sinensis* y en ellas existe: agua, proteínas, hidratos de carbono, minerales, vitaminas y polifenoles del tipo flavonoides. Los principales flavonoides en el té verde son las catequinas, las cuales constituyen cerca de un tercio de su peso seco total. La catequina más abundante es la galato de epigallocatequina (>50%). En los últimos años ha crecido el interés en el té verde y sus catequinas y su papel en la disminución de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares (ECV). El objetivo de este trabajo es revisar numerosos estudios acerca del té y su relación con diferentes factores de riesgo de ECV. De algunos de ellos puede resumirse que el té verde y sus catequinas (i) tienen efecto reductor del peso corporal, posiblemente a través de su interferencia sobre el sistema adrenosimpático y de enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos, (ii) presentan actividad antioxidante con incrementos de la fase de latencia en la oxidación de las LDL, (iii) reducen la absorción del colesterol y sus niveles plasmáticos, (iv) interfieren en la expresión de moléculas de adhesión celular, (v) tienen actividad antitrombótica al inhibir la agregación plaquetaria y (vi) disminuyen la presión arterial sistólica y diastólica. Aunque estos efectos positivos sugieren que un consumo superior a 7 tazas de té verde al día (3,5 g de catequinas diarias) es una buena elección para prevenir las ECV, son aún necesarios más estudios que profundicen en los mecanismos de acción del té verde y sus catequinas en el ser humano, para así poder recomendar su uso en la prevención y tratamiento de las ECV en la población en general o sólo en individuos "diana".
Palabras clave: Agregación plaquetaria, aterosclerosis, catequinas, enfermedad cardiovascular, lesión endotelial, lipoproteínas, peroxidación, té verde.

SUMMARY. The green tea, a good choice for cardiovascular disease prevention? Tea (*Camellia sinensis*) has been used for centuries as a medical drink. Around two-thirds of the world's population drink tea. It is originated from southern China and extensive cultivated in Asia and in central African countries. Tea can be grouped into three main types, black, oolong, and green tea. Green tea is not fermented and is a major beverage consumed in Asian countries. Green tea is produced from freshly harvest leaves of the tea plant and they contain water, proteins, carbohydrates, minerals, vitamins and polyphenols of the flavonoid type. The major flavonoids in green tea are catechins which constitute about one third of its total dry weight. The major catechin present is epigallocatechin gallate (>50%). New data have increased the interest in green tea or its catechins and its role in treatment of cardiovascular disease (CHD) risk factors. The aim of the present paper is to review some studies that have found a relationship between green tea and CHD risk factors. From some of them it can be summarized that of green tea and its catechins consumptions (i) decrease body weight by interfering within the sympathoadrenal system and fatty acid synthesis, (ii) decrease cholesterol absorption and plasma levels, (iii) have strong free radical-scavenging activity inhibiting LDL oxidation, (iv) reduce the adhesion molecule expression, (v) have antitrombotic activities by inhibiting platelet aggregation and (vi) decrease systolic and diastolic blood pressures. The positive effects found suggest that a daily intake of 7 cups of green tea (3.5 g catechins) is a good choice for CHD prevention; however, it is still necessary more studies to check the action of the green tea and its catechins in humans in order to recommended its use in the general population or only in target subjects.

Key words: Atherosclerosis, catechins, cardiovascular diseases, endothelial lesion, green tea, lipoproteins, platelet aggregation, peroxidation.

Abreviaturas: ACAT: acil CoA colesterol acil transferasa; AGP: ácidos grasos poliinsaturados; Apo: Apolipoproteína; C: (+)-catequina; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; CG: (+)-galato de catequina; DAG: diacilglicerol; EC: (-)-epicatequina; ECG: (-)-galato de epicatequina; EGC: (-)-epigallocatequina; EGCG: (-)-galato de epigallocatequina; F: inositol trifosfato; GC: (+)-galocatequina; GCG: (+)-galato de galocatequina; HDL-colesterol: colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad;

HUVECs: células endoteliales de cordón umbilical humano; F: flavanoles; IFABP: proteína ligante intestinal de ácidos grasos; IP₃: inositol trifosfato; LCAT: transferasa de grupos acilos desde la lecitina al colesterol; LDL: lipoproteínas de baja densidad; PCC: proteína quinasa C; PG: prostaglandina; PIP₂: fosfatidil inositol difosfato; TF: teaflavinas; TF₂A: 3-galato de teaflavina; TF₂B: 3'-galato de teaflavina; TF₃: 3,3'-digalato de teaflavina; TR: tearubiginas; Tx: tromboxano-

INTRODUCCION

El té es una de las bebidas más antiguas del mundo y sus extractos son uno de los agentes medicinales usados desde tiempos ancestrales (1). Después del agua es la bebida de preferencia y actualmente dos tercios de la población mundial lo ingieren (2-6). Durante siglos, tanto el té verde como el negro, constituyeron las bebidas seguras y de preferencia en los países asiáticos. Sin embargo, no fue hasta el siglo XVI cuando se popularizó en occidente, gracias a los exploradores y comerciantes europeos. Entonces era comercialmente muy caro y Rusia adquirió una gran importancia en "la ruta" del té (7). En China, se lleva consumiendo desde hace casi 3000 años, siendo este país su principal productor. Es ampliamente cultivado en el sur de Asia, incluyendo China, India, Japón, Taiwan, Sri Lanka e Indonesia (1). En Japón su consumo comenzó gracias a ser introducido por unos monjes budistas en el año 800 d.c. En la era Kamakura (1191-1333) los monjes describieron los efectos beneficiosos del té en su libro "Manteniendo la salud bebiendo té". De este pasaje podemos deducir que el té verde ha sido valorado como potente medicación desde tiempos remotos (1,8).

El té verde es consumido mayoritariamente en los países asiáticos, donde su significado va más allá del de una simple bebida, siendo sinónimo de bienestar, armonía, belleza, serenidad y su consumo se convierte en un ritual de gran importancia social y cultural. Por su parte, el té negro, es más consumido en los países occidentales (9) en donde su consumo, en términos generales, también tiene connotaciones de importancia socio- cultural.

Descripción de la planta y origen geográfico

El té pertenece a la familia Teáceae. Es un árbol pequeño de hoja perenne que puede llegar a medir 5-10 m de alto en estado salvaje, aunque cuando se cultiva no suele sobrepasar los dos metros de altura. Sus hojas son de color verde oscuro, se disponen alternas y miden generalmente entre 5-10 cm de largo por 2-4 cm de ancho. Son pequeñas, dentadas en sus dos terceras partes superiores y se disponen aisladamente o en grupos de 2 ó 3. El fruto es una pequeña cápsula redondeada, en cuyo interior se localizan las semillas (10).

Aunque originario del sudeste asiático, desde la India y Sri Lanka hasta China o Japón, el té crece de manera extensa en las regiones tropicales y subtropicales. Para que el crecimiento del té sea óptimo, requiere suelos bien drenados, ricos en materia orgánica y con un pH ligeramente ácido. Las condiciones ideales de cultivo son clima húmedo, temperatura que oscile entre 14-27 °C, irradiación solar de un mínimo de 5 horas diarias, humedad del aire entre 70-90% y lluvias abundantes y regulares durante todo el año. La recolección tiene lugar cuando la planta alcanza los 3 años de edad (11).

Tipos principales de té

Según el Código Alimentario Argentino, por té genéricamente se entiende exclusivamente el producto obtenido por el procesamiento conveniente de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos de la especie *Camellia sinensis* (12). El Real Decreto 13547/ 1983 (España) define al té como las hojas jóvenes y las yemas sanas y limpias de distintas especies del género botánico *Thea* en buen estado de conservación, convenientemente preparadas para el consumo humano, y poseyendo el aroma y gusto característicos de su variedad y zona de producción.

Existen cuatro tipos principales de té, pero a ellos hay que sumar las múltiples variedades existentes dentro de cada categoría que suman más de 30 té en todo el mundo (2):

- Té blanco: Se produce a escala muy limitada lo que explica el elevado precio que alcanza. China y Sri Lanka son los principales exportadores.
- Té semifermentado o té Oolong: Se elabora principalmente en China y en Taiwán.
- Té de fermentación completa: El té negro pertenece a esta categoría. Su manufactura incluye un paso de oxidación enzimática en el cual la mayoría de las catequinas (polifenoles) se convierten en productos de condensación complejos (teaflavinas y tearubiginas) (13).
- Té no fermentado: El té verde es un ejemplo de este tipo de té. Su elaboración proviene de las hojas frescas, secas y jóvenes de la *Camellia sinensis*; a diferencia de los anteriores, no se somete a proceso de oxidación enzimática (4,13). El té verde es poco aromático, de sabor amargo y la infusión obtenida es verdosa (7). También se le conoce como *Thea sinensis* L (4).
- Té descafeinado: es el té verde o negro o semifermentado, desprovisto de la mayor parte de su cafeína.
- Extracto soluble de té: es el producto soluble en agua, obtenido por total o parcial evaporación de la infusión de té.
- Té aromatizado: son los té definidos anteriormente, los que por adición de sustancias aromáticas autorizadas, plantas aromáticas o especias, se les comunica un aroma o sabor característicos.

Variedades y tipos de té verde

Existen numerosas variedades de té verde en China y Japón (7). Las más conocidas son:

- Lung Chen: Es la variedad más famosa y tal término significa "Pozo del Dragón".
- Bancha: Se extrae del tallo de la planta del mismo nombre.
- Gunpowdwer: Se hierve con menta y azúcar. Es agridulce.
- Sencha: Es de color amarillo y tiene sabor a verduras.
- Matcha: Se sirve en la ceremonia del té en Japón
- Gyokuro: Sabor a hierba cortada.
- Pi Lo Chun: Aroma a árboles frutales. Significa "caracol verde"

Fabricación del té verde

La importancia que se le atribuye al té verde en cuanto a sus propiedades saludables frente al resto de té reside en su proceso de fabricación. Las hojas no fermentadas al sol contienen mayor número de polifenoles, ya que las enzimas que contribuyen a su oxidación quedan inactivas (14).

El proceso es el siguiente (7): 1. Inmediatamente después de recolectar las hojas se llevan a la fábrica. Se cuecen al vapor o por acción del aire caliente para detener el proceso de oxidación de las enzimas. 2. Se enrollan las hojas sobre placas o bandejas calientes para reducir el contenido de humedad. 3. Se retuercen las hojas, para adaptar el contenido de agua. 4. Se dejan secar y se envasan. Todos estos procesos no alteran la composición química del té verde.

Composición química del té

A pesar de que tanto el té verde como el té negro se obtienen a partir de las hojas de la especie *Camellia sinensis*, presentan diferente composición química debido a que, como ya se ha explicado, se aplican diferentes procedimientos para su obtención (9). En la hoja fresca de la planta destaca la presencia de agua, proteínas (15-20%), glúcidos (35%), sales minerales, vitaminas (ácido ascórbico y algunas del complejo B), bases púricas (cafeína, teobromina y teofilina) y derivados polifenólicos (flavonoides) (9) (Tabla 1).

TABLA 1
Composición del té verde y negro (por 100 g).

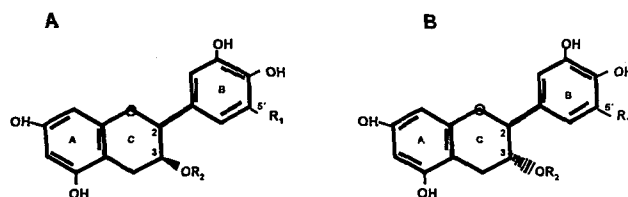
	Té verde		Té negro	
	Hoja	Infusión*	Hoja	Infusión*
Macronutrientes (g)				
Proteínas	24	0,1	20,6	0,2
Lípidos	4,6	0	2,5	0
Azúcares	35,2	0,1	32,1	0,1
Fibra	10,6	0	10,9	0
Cenizas (g)	5,4	0,1	5,2	0,1
Minerales (mg)				
Calcio	440	2	470	2
Fósforo	280	1	320	3
Hierro	20	0,1	17,4	0
Sodio	3	2	3	2
Potasio	2200	18	2000	16
Vitaminas				
Vitamina A (UI)	13000	0	900	0
Tiamina (mg)	0,35	0	0,1	0
Riboflavina (mg)	1,4	0,03	0,8	0,01
Niacina (mg)	4	0,1	10	0,2
Vitamina C (mg)	250	4	0	0
Cafeína (mg)	2,3	0,02	2,7	0,05

Infusión preparada con 3 gramos de hojas en 100 ml de agua hirviendo durante 2 minutos. Adaptado de Yamamoto et al (15)

De los polifenoles totales, el 59,9% lo constituyen las catequinas (9). Las catequinas están formadas por 15 átomos de carbono y contiene dos núcleos fenólicos (anillos A y B) que están unidos por tres átomos de carbono que forman parte, junto con un átomo de oxígeno, del anillo C. Los carbonos 2 y 3 del anillo C son asimétricos y según la posición espacial de los sustituyentes del carbono 3, las catequinas pueden ser enantiómeros (+) o (-) (15). Se han definido ocho catequinas diferentes al extraer los polifenoles del té con etilacetato, siendo las mayoritarias el (-)-galato de epigalocatequina (EGCG) y (+)-galocatequina (GC), que representan el 51,8% de las ocho catequinas. En menor cantidad se encuentran otras catequinas (15,16) (Figura 1).

FIGURA 1

Estructura química de las catequinas del té



A: enantiómeros (+)

R1	R2
H	H
H	galato
OH	H
OH	galato

Catequina
catequina (C)
galato de catequina (CG)
galocatequina (GC)
galato de galocatequina (GCG)

B: enantiómeros (-)

R1	R2
H	H
H	galato
OH	H
OH	galato

Catequina
epicatequina (EC)
galato de epicatequina (ECG)
epigalocatequina (EGC)
galato de epigalocatequina (EGCG)

Según el método empleado en la obtención, la cantidad de estos flavonoides es diferente. En la obtención del té negro se dejan fermentar las hojas, lo que permite que el enzima polifenol oxidasa oxide las catequinas de la hoja a quinonas, que posteriormente condensan para formar flavanoles (F), tearubiginas (TR) y teaflavinas (TF), que son una mezcla de teaflavina 1 (TF₁), 3-galato de teaflavina (TF₂A), 3'-galato de teaflavina (TF₂B) y 3,3'-digalato de teaflavina (TF₃) (6). En el caso del té verde no se dejan fermentar las hojas y el enzima polifenoloxidasa no actúa, por lo que las catequinas apenas sufren transformación y son los componentes mayoritarios de la hoja, representando el 6-16% del peso seco de la misma (18,19) (Tabla 2). Si se considera que las catequinas constituyen el 10% del peso seco de la hoja del té y que para preparar una taza de infusión de té verde se utilizan aproximadamente 4-5 g de hojas secas, una taza de té contendrá aproximadamente 400-500 mg de catequinas (21).

TABLA 2
Concentración (mg/100 g) de flavonoides en
los diferentes tipos de té

	Té negro (infusión) ¹	Té verde (infusión) ¹
Catequina	1,4	2,85
Epicatequina	2,34	8,66
Galato de epicatequina	7,15	21,96
Epigallocatequina	9,23	16,72
Galato de epigallocatequina	10,31	88,32
Galocatequina	1,26	Trazas
Teaflavinas	6,09	0,07
Tearubiginas	73,44	1,08

1. Los datos corresponden para cada flavonoide a la suma de los enantiómeros (+) y (-)

Adaptado de Bhagwat et al (20)

Procesos que afectan a la concentración de catequinas del té verde

La composición del té varía según la especie, estación del año, edad de las hojas, clima y prácticas hortícolas (22). Las hojas manufacturadas jóvenes contienen menos EGCG, (-)-epigallocatequina (EGC), EC y CT que las más viejas, no ocurriendo así con los niveles de cafeína, que son mayores en las primeras (23). La temperatura es uno de los parámetros más importantes que afectan a la estabilidad de las catequinas. En la preparación tradicional del té, en la que se deja enfriar el agua previamente hervida, la disminución en el contenido de catequinas es muy pequeña. En algunos estudios se ha comprobado que cuando una solución de catequinas se deja reposar durante 7 horas a temperatura ambiente no se producen pérdidas importantes de las mismas. Sin embargo, cuando esta misma solución se deja durante 15 minutos a 98°C se produce una pérdida del 10 al 15% (21).

Efectos fisiológicos y terapéuticos del té verde

Vía de administración y biodisponibilidad de las catequinas del té

Como se ha comentado, el té es muy rico en catequinas (Tabla 2). En particular, los extractos de té verde contienen elevadas cantidades de (-)-EGCG, que representa más del 50% de las catequinas totales y es, además, la que mayor actividad farmacológica presenta (24). Se han asociado al consumo de té diferentes efectos beneficiosos sobre la salud y en particular estos efectos se han atribuido a las principales catequinas del té verde: EGCG, EC, EGC y (-)-galato de epicatequina (EGC) (25,26).

Diferentes estudios han demostrado que los polifenoles, tanto como si se toma infusión de té o extracto de catequinas,

presentan efectos indirectos a nivel gastrointestinal y un efecto directo sobre diferentes tejidos, ya que se han encontrado polifenoles en sangre, orina, saliva y heces tras su ingesta (27-29). Al aumentar el consumo de té, se produce un aumento en la excreción de EC y EGCG, aunque esta relación no es muy neta (28).

La administración oral de EGCG es menos eficaz que la intraperitoneal (debido a que en el tracto gastrointestinal la EGCG puede sufrir degradaciones, interacciones y a que la absorción es menos eficaz). Sin embargo, el consumo prolongado de té verde o de extractos que contengan EGCG puede imitar algunos de los efectos que aparecen en animales administrados con EGCG intraperitonealmente (1).

Es interesante señalar que al añadir leche al té, práctica muy habitual en ciertos países como el Reino Unido (20), se induce una disminución de la biodisponibilidad de los polifenoles del té que provoca una disminución de la actividad de esta infusión in vivo, sin que se afecte su capacidad antioxidante in vitro (2). Estos efectos sólo se observan cuando la cantidad de leche añadida es muy elevada (25%). Cuando se añade un 10-15% de leche, que es la cantidad que habitualmente se utiliza, no se afecta en forma relevante la biodisponibilidad de las catequinas del té ni sus efectos in vivo (30,31). Existen dos hipótesis para explicar dicha interacción. La primera de ellas es la formación de complejos resistentes a la hidrólisis gástrica entre los polifenoles del té y las proteínas de la leche, lo que impide su absorción a nivel gastrointestinal (32). La segunda hipótesis es que los polifenoles son solubles a pH ácido, al cual se encuentran en forma no ionizada y se absorben con facilidad. La leche, al producir un ligero aumento del pH gástrico, provoca una ionización de los polifenoles e impide su absorción (33).

Mecanismo de acción del té en el control de peso corporal

La obesidad es una enfermedad metabólica muy prevalente en la sociedad occidental. La resistencia a la insulina que se produce en la mayoría de los pacientes obesos es clave promoviendo un incremento del riesgo cardiovascular debido a la producción incrementada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL) (34,35). A su vez en estos pacientes es frecuente la hipertensión ligada a la hiperinsulinemia y el incremento de la trombogénesis (35). Para conseguir una disminución del peso corporal se puede actuar en términos generales de dos posibles formas, bien reduciendo la ingesta energética, bien aumentando el gasto energético (34,36,37). El gasto energético lo constituyen la actividad física, el gasto energético basal junto con la termogénesis obligatoria y la termogénesis facultativa, en respuesta a determinadas situaciones, como la ingesta de energía y la exposición al frío (38). El sistema nervioso simpático es el encargado de regular la termogénesis y la oxidación de la grasa, por eso, un posible tratamiento contra la obesidad incluiría a aque-

llas sustancias que actúan sobre dicho sistema o sobre su neurotransmisor, la noradrenalina (39-41). A este grupo de sustancias que tienen efectos sobre el peso corporal pertenecen algunos componentes del té (39,42,43). Las catequinas del té actúan *in vitro*, inhibiendo la catecol o-metiltransferasa (COMT), enzima responsable de la degradación de la noradrenalina, lo que produce un aumento del tiempo de actuación de dicho neurotransmisor sobre los receptores β_3 de los adipocitos marrones, incrementando así la termogénesis y/o la oxidación de la grasa (34,44,45). Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la capacidad de la cafeína, cuando se administra junto con adrenalina, de inhibir la fosfodiesterasa intracelular. Esta inhibición conlleva un aumento del AMPc en el adipocito, que es un mediador de la acción de las catecolaminas sobre la termogénesis (45,46). Teniendo en cuenta estos hechos, en un estudio realizado en 10 varones sanos de 24 a 26 años se comprobó que el gasto energético en 24 horas y la oxidación de la grasa aumentaban al administrar un extracto de té (90 mg de EGCG) y cafeína (50 mg) (37). Esto se debía a la acción sinérgica de la cafeína con los polifenoles del té y, en concreto, con el más abundante, la EGCG (47). Al considerar los resultados de los estudios *in vitro* de la termogénesis en el tejido adiposo marrón de ratas (48) y los resultados *in vivo* de la biodisponibilidad de las catequinas en humanos (49,50) puede afirmarse que los efectos termogénicos del extracto de té verde se deben, al menos en parte, a las interacciones entre las catequinas del té (fundamentalmente la EGCG), la cafeína y la noradrenalina (37). Siguiendo con ésta línea de investigación, al administrar inyecciones intraperitoneales de EGCG a ratas, se producía una pérdida de peso en las mismas debido a una disminución en la ingesta, hecho que no ocurría al administrar (-)-epicatequina (EC), EGC ni ECG (1,51). Esta pérdida de apetito podría deberse a un efecto en la eficacia de la oxidación de lípidos más que a un efecto directo de la EGCG (47) o bien a una acción relacionada con neuropéptidos diferentes de la leptina, ya que la EGCG produce el mismo efecto en ratas knockout que no presentan el receptor para leptina (43,51). Otros posibles mecanismos por los que el té podría contribuir a la pérdida de peso se han observado en preadipocitos 3T3-L1 de ratones. La EGCG a una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$, pero no la EC, EGC ni la ECG, inhibió la proliferación de los preadipocitos en un 50% y la acumulación de triacilglicerol en un 54% en estas células durante su diferenciación a adipocitos (43). Además, tanto la EGCG como la ECG en una concentración de 0,31 mmol/L, inhibieron un 50% la actividad de la acetil-CoA carboxilasa, enzima que interviene en la biosíntesis de ácidos grasos (52).

Según los resultados obtenidos en animales de experimentación se requeriría en humanos un consumo diario de bebidas de té verde equivalente a 20 g o más de té seco a 4 tazas al día de infusión, para mostrar los mismos efectos (1).

Acción del té sobre la absorción de colesterol y concentración de los lípidos y lipoproteínas plasmáticas

Diversos estudios en animales de experimentación han puesto de manifiesto que las catequinas disminuyen la absorción de colesterol y los niveles plasmáticos de este colesterol (53-59), obteniendo resultados similares en humanos (60,61). La disminución del colesterol en plasma se debe fundamentalmente al efecto de la EGCG del té (57,59,62). Para la absorción del colesterol en el yeyuno proximal es necesario, en primer lugar, que se produzca su emulsificación de los lípidos en el estómago, la hidrólisis posterior en el intestino delgado de los ésteres de colesterol por la colesterol esterasa pancreática y la posterior solubilización en micelas. Una vez en las células intestinales, el colesterol se reesterifica y se transporta a la linfa por los quilomicrones (63). De esta manera, las moléculas que influyen en la absorción de colesterol podrían actuar bien interfiriendo en la afinidad de las micelas por los enterocitos o en la afinidad del colesterol por las micelas. Estas alteraciones afectarían al metabolismo hepático del colesterol y podrían afectar a la síntesis y catabolismo de lipoproteínas (59). Estos efectos se han comprobado en estudios realizados *in vitro* y en animales de experimentación. Así, se ha observado que las catequinas del té verde disminuyen la absorción intestinal del colesterol al disminuir su solubilidad en las micelas (56). En concreto, al añadir EGCG aislada en concentraciones crecientes desde 109 μM hasta 436 μM a una mezcla de micelas, la concentración de colesterol en las mismas disminuía un 65% (59). Además en ese estudio también se encontró que la EGCG inducía un aumento del tamaño de las micelas (59), hecho que afecta a su afinidad por la membrana de los enterocitos y a la solubilidad del colesterol en las mismas (64).

Otros han encontrado que la incorporación de las catequinas a las bicapas de fosfolípidos disminuyen la fluidez de las mismas afectando a su estructura, siendo esta acción realizada de forma más eficaz por las catequinas esterificadas con galato que por las catequinas no sustituidas (65,66). Este hecho produce una disminución de la captación del colesterol por los enterocitos, lo que explicaría la disminución del colesterol plasmático observada en animales de experimentación. En concreto, al añadir un 1% de EGCG a la dieta de ratas, el colesterol plasmático de estos animales disminuye significativamente sin que la concentración del colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol) se vea afectada (59). Sin embargo, al administrar una dosis del 2,5% de polifenoles (constituída por una mezcla de catequinas), a ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol, se producía un aumento del HDL-colesterol más que un descenso del colesterol total (67).

En estos estudios en los que se administraba una dieta rica en colesterol a animales de experimentación se observó además de una disminución en sus niveles séricos que las

catequinas actuaban disminuyendo la absorción intestinal del mismo (53,56,68), lo que producía un aumento en heces de lípidos totales y colesterol (53) y de ácidos grasos y esteroides neutros y ácidos (68). Otros en ratas ovariectomizadas encontraron que una dosis de 20 g de hojas de té disminuía la absorción linfática de colesterol y alteraba la absorción de ácidos grasos (58).

Con respecto a la actividad de algunas enzimas, estudios *in vitro* muestran que tanto la lipasa gástrica como la lipasa pancreática son drásticamente inhibidas por el té verde (69), mientras que las actividades de la 3-hidroximetilglutaril-CoA reductasa, ácido graso sintasa y colesterol 7 α -hidroxilasa no se encuentran afectadas. Esto sugiere que el efecto de las catequinas se debe, tal y como se describe en los estudios ya comentados, a la disminución de la absorción intestinal del colesterol (57,70).

Los resultados obtenidos en animales de experimentación sugieren la posibilidad de su extrapolación al ser humano, en particular en lo referente al EGCG (59). La mayoría de las investigaciones llevadas a cabo se han realizado en japoneses en los que el consumo de té es una práctica muy habitual (61). Se encontró una relación inversa entre el consumo de té y los niveles de colesterol total en suero (61,71-73), y, sólo en al-

guno de ellos, una disminución de los triglicéridos y un aumento de la concentración de HDL-colesterol (72,73), así como un bajo cociente de riesgo LDL-colesterol/HDL-colesterol (72). En estudios realizados hace años (71-73) sólo se incluyeron varones pero cuando más recientemente se introdujeron mujeres en la muestra, no se encontró ningún efecto del té sobre los niveles lipídicos sanguíneos (60). Estos resultados podían deberse en principio al reducido número de individuos estudiados, ya que posteriormente, en una muestra mayor en la que se incluían tanto a hombres como mujeres, sí se obtuvieron resultados positivos del consumo de té sobre los niveles de lipoproteínas (61).

En la mayoría de los estudios realizados se ha observado un efecto positivo sobre los niveles de colesterol en suero (Tablas 3 y 4), estando la disminución del 1% de este lípido asociada con una reducción del 2 al 3% en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en países occidentales (74) y del 5% en países orientales (75). Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar el efecto beneficioso del té verde sobre los niveles lipídicos sanguíneos (61), y en particular sobre aspectos más específicos tales como concentración de Lp(a), tamaño y composición de LDL y HDL, etc.

TABLA 3
Efectos del consumo de té verde sobre los lípidos sanguíneos en humanos

Investigador	Fecha del estudio	Muestra	Consumo de té	Resultados obtenidos
Kono et al, (71)	Desde 1986 hasta 1988	1306 varones	0-2 tazas/día = 9 tazas/día	Disminución del CT 8 mg/dL (= 9 tazas/ día)
Imai (72)	Desde 1986 hasta 1990	1371 varones	= 3 tazas/día 4-9 tazas/día = 10 tazas/día	Ver resultados detallados en Tabla 4
Kono et al (73)	Desde 1991 hasta 1992	2062 varones	< 9 tazas/día = 9 tazas/día	Disminución del CT y LDL 6,2 mg/dL en ambos casos (= 9 tazas/ día)
Tsubono y Tsugane (60)	Desde 1989 hasta 1991	207 varones y 164 mujeres	<1 taza/día 1-4 tazas/día =5 tazas /día	Ningún efecto sobre el nivel de lípidos
Tokunaga et al (61)	Desde 1995 Hasta 1996	8476 varones 5440 mujeres	= 10 tazas/día > 10 tazas/día	Disminución del CT (0,6 mg/dL con 1 taza/día y 4,16 mg/dL con >10 tazas/día).

CT: colesterol total, LDL: lipoproteínas de baja densidad.

TABLA 4
Modificaciones de los lípidos y lipoproteínas plasmáticas por el consumo de té

	< 3 tazas/día	4-9 tazas/día	>10tazas/día
Colesterol (mmol/L)	4,85±0,05***	4,76±0,03	4,58±0,05***
Triglicéridos (mmol/L)	1,65±0,06*	1,60±0,05	1,45±0,07*
LDL + VLDL (% del total de lipoproteínas) ¹	62,5±0,3	62,6±0,3	61,7±0,2
HDL (% del total de lipoproteínas) ¹	36,4±0,3*	36,4±0,3	37,4±0,4*

¹ Determinados por electroforesis en gel de agarosa

***p<0,001 *p<0,05.

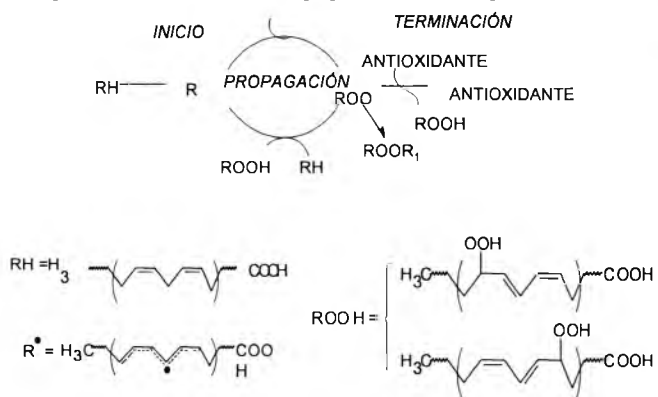
Adaptado de Imai (72)

Efecto antioxidante de los polifenoles (catequinas) del té verde frente a la peroxidación de LDL

Los polifenoles presentan una fuerte actividad antioxidante en muchos sistemas lipídicos y en particular contra la oxidación de las LDL, aspecto de importancia crucial en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (76-79). En las LDL se produce una modificación peroxidativa de sus ácidos grasos poliinsaturados (AGP) por la acción de los radicales libres (80). En este proceso intervienen iones metálicos y mecanismos oxidativos existentes en las células endoteliales, músculo liso y macrófagos (81). Se han propuesto como candidatos del origen de la oxidación de los AGP a las enzimas NADPH oxidasa, mieloperoxidasa, citocromo P₄₅₀, la cadena de transporte electrónico mitocondrial, xantina oxidasa, ceruloplasmina y lipooxigenasa (82). Cuando los niveles de colesterol sérico están elevados se producen radicales superóxido en grandes cantidades (O₂•) que inactivan el NO y promueven la formación de otros radicales de oxígeno como el peroxinitrito y el radical hidroxilo (83) (Figura 2).

FIGURA 2

Esquema de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las lipoproteínas de baja densidad



RH.- Ácido graso insaturado R.- Radical libre

ROO.- Radical peróxido ROOH.- Hidroperóxido

Adaptado de Sánchez-Muniz y Sánchez-Montero (87)

Las sustancias conteniendo radicales libres son neutralizadas por los antioxidantes endógenos (K-tocoferol, 2-carotenos, ubiquinol y otros) de las lipoproteínas. En estas condiciones las LDL comienzan a oxidarse, denominándose a este periodo "fase de latencia". Cuando se agotan los antioxidantes, los AGP son atacados por radicales libres y se forman compuestos con dobles enlaces conjugados. A continuación, se producen peróxidos lipídicos y se propagan los radicales libres destruyendo nuevas moléculas de AGP (84) (Figuras 2 y 3).

FIGURA 3

Modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Se esquematizan los cambios cualitativos más importantes

Apo B degradada y con pérdida de lisina debido a modificaciones covalentes



Los hidroperóxidos lipídicos pueden fragmentarse a aldehídos, como el malondialdehído o el 4-hidroxinonal que, al unirse a grupos ε-aminos de la apolipoproteína (Apo) B-100, proporcionan carga neta negativa a la LDL y aumenta su reconocimiento por los receptores barrenderos (scavenger) (85,86) (Figura 3). Además la Apo B-100 puede fragmentarse por oxidaciones no enzimáticas y algunos de los fragmentos formados pueden ser transferidos desde las LDL nativas a la LDL oxidadas, lo que produce un aumento de la carga negativa de estas partículas (88,89) (Figura 3).

Numerosas investigaciones han demostrado los efectos antioxidantes y la capacidad para neutralizar radicales libres de las catequinas (90-96). Para llevar a cabo esta última acción es fundamental la presencia de 3 grupos hidroxilos en el anillo B y del grupo galato en la posición 3 de la catequina (91,92,94).

La capacidad antioxidante del té ha sido evaluada *in vitro* (2,97,98) e *in vivo* tras la ingesta de té (2,3,97,99,100). Los estudios realizados *in vitro* han puesto de manifiesto la capacidad de los flavonoides para inhibir de forma dosis-dependiente la oxidación inducida por Cu^{2+} de las LDL aisladas del plasma (97,99,101-105). Para explicar este hecho se han propuesto diferentes mecanismos en los que intervienen las catequinas tales como (i) la quelación del Cu^{2+} y de otros metales iónicos, (ii) el efecto directo como antioxidante interrumpiendo la reacción de radicales libres en cadena, (iii) la aceleración del reciclaje del radical tocoferilo a tocoferol de la LDL (97,106), (iv) la inhibición de la enzima lipooxigenasa de las células endoteliales (107) y (v) la prevención de la fragmentación de la Apo B de las LDL (89,108). Para observar el efecto antioxidante de las catequinas en plasma, y no de las LDL aisladas, se necesita una menor concentración de las mismas, lo que indica que su acción antioxidante también se debe a su capacidad de donar hidrógeno (109). Este efecto antioxidante es mayor en la ECG, seguida de EGCG, EC y EGC (108,110). Además, en plasma también se ha observado un retraso de la utilización de antioxidantes endógenos liposolubles (α -tocoferol y β -caroteno), previniendo su depleción y disminuyendo la peroxidación lipídica gracias a su capacidad de atrapar a los radicales libres que inician la oxidación (91,94,106,107,111). Se ha observado también un potente efecto dosis-dependiente sobre la prolongación del tiempo de iniciación de la oxidación o fase de latencia (99,110) y una disminución de la susceptibilidad de las LDL a la oxidación mediada por macrófagos, presentando la mayor actividad la EGCG a una dosis de 400 $\mu\text{mol/L}$ (99). Paradójicamente, se ha puesto de manifiesto el poder pro-oxidante de las catequinas cuando están en presencia de cobre al producirse un aumento de la división del DNA y una mayor peroxidación de AGP (112).

Los estudios anteriormente descritos se han centrado en los efectos antioxidantes de las catequinas del té verde. Sin embargo, es de interés comentar que también presentan actividad antioxidante los polímeros formados a partir de la oxidación de las catequizas, los cuales son excelentes antioxidantes en todos los sistemas lipídicos y no lipídicos, en sistemas enzimáticos y no enzimáticos, y además, no tienen actividad prooxidante (101). El mecanismo propuesto para esta capacidad antioxidante incluye el reconocimiento y quelación de radicales libres, la quelación de iones metálicos, la activación de enzimas antioxidantes y la inactivación de enzimas oxidantes (101).

En los estudios *in vivo* en los que se aislaron las lipoproteínas del suero (3,97,99,100) se observó que la incorporación de polifenoles a dichas lipoproteínas era muy pequeña y que además no se encontraba ningún efecto del té sobre la oxidación de las LDL (3,14,20). Sin embargo, al cultivar las LDL aisladas con células endoteliales en presencia de un extracto de té verde de diferentes concentraciones (1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$) sí se observó una inhibición de la oxidación de las LDL inducida por dichas células. En concreto, la oxidación estaba totalmente inhibida al usar la concentración más elevada del extracto de té (57). También se observaron los efectos antioxidantes del té frente a la oxidación de las lipoproteínas en suero y no en un tampón, ya que en el suero las condiciones son más similares a las de la zona subendotelial arterial, que es donde se produce la formación de lipoproteínas mínimamente oxidadas (113). Solamente se encontró que la actividad antioxidante del suero aumentaba de forma significativa en algunos de ellos (2,3,67), y de forma no significativa en otros (14). Además, en un estudio hecho en ratas con enfermedad osteogénica, y por lo tanto con deficiencia de vitamina C, se midió la capacidad del té verde para modificar la oxidación de LDL y se encontró que el ácido ascórbico plasmático y el té verde prolongaban la fase de latencia un 25% y disminuían la susceptibilidad de las LDL a la oxidación por efecto sinérgico con agentes lipofílicos (vitamina E) (114). Por otro lado, en conejos hipercolesterolémicos se observó que el té verde aumentaba los niveles de vitamina E plasmáticos un 63% y disminuía el coeficiente máximo de oxidación de las LDL desde $13,4 \pm 0,4$ nmol/minuto a $11,2 \pm 0,6$ nmol/minuto en 13 semanas (13).

Aunque las evaluaciones de la oxidabilidad de las lipoproteínas *in vitro* pueden proveer una guía útil para valorar el potencial antioxidante del té, los efectos en humanos son muy limitados (98) (Tabla 5).

En resumen, se puede afirmar que el mecanismo de acción de los antioxidantes del té verde en el organismo cursa con su acumulación en la pared arterial y con la disminución de la oxidación de las LDL (al aumentar el estado antioxidante de las células, mediante la quelación de iones metálicos o inhibición de la actividad de enzimas oxidantes) (13). Independientemente del mecanismo de acción, la mayoría de los estudios realizados sugieren que el consumo diario de té verde convierte a las LDL en más resistente a la oxidación, lo que conduce a una disminución del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (115).

TABLA 5
Efectos del consumo de té verde en la capacidad antioxidante del plasma

Investigador	Lugar	Muestra	Consumo de té	Resultados obtenidos
Serafini et al (2)	Italia	10 individuos sanos	300 ml	Aumenta la capacidad antioxidante del plasma (Δ TRAP ¹ = 158 μ mol/L)
Van het Hof et al (3)	Holanda	45 individuos sanos	900 ml	Sin efecto
Ishikawa et al (99)	Japón	14 individuos sanos	750 ml	Prolongación del "lag time" 8 minutos
Hodgson et al (98)	Australia	20 individuos sanos	1000 ml	Prolongación del "lag time" 4 minutos
Hodgson et al (14)	Australia	13 individuos hipertensos e hipercolesterolémicos	1000 ml	Sin efecto

¹ Δ TRAP: Variación del potencial antioxidante total del plasma

Acción del té sobre la adhesión de monocitos al endotelio vascular

Una fase fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis lo constituye la adhesión de monocitos a la pared endotelial y su posterior infiltración y diferenciación a macrófagos (35). Para que los monocitos se adhieran a la pared endotelial es fundamental la presencia de sustancias tales como la molécula de adhesión a células vasculares (1VCAM-1) que es la que tiene una mayor importancia en la iniciación de la aterosclerosis (116), la molécula de adhesión intercelular (1ICAM-1) y la molécula de adhesión de leucocitos al endotelio-E (E-selectina) (117); siendo necesario para la expresión de la molécula VCAM-1 la presencia del factor de transcripción NF-8B (118,119).

En células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs), en las que se inducía la expresión de las moléculas de adhesión anteriormente citadas y posteriormente se cultivaban con concentraciones de catequinas entre 10 y 100 μ M, se vio que únicamente se inhibía de forma dosis-dependiente la expresión de VCAM-1. Dicha inhibición se producía a nivel del RNAm y no afectaba a la activación del factor NF-8B. Por otra parte la catequina más eficaz resultó ser la EGCG, seguida de la ECG, mientras que ni la EC ni la EGC mostraron efecto significativo (120). Esto indica que sólo las catequinas que presentan el grupo galato reducen la expresión de las moléculas de adhesión (121).

Acción del té sobre la agregación plaquetaria

Las plaquetas presentan un importante papel tanto como en el mantenimiento de la hemostasia como en la formación de trombos, ya que para esto es necesario la activación y la agregación de las plaquetas (122). Por esta razón, la inhibición de la función plaquetaria representa un camino prometedor para la prevención de las trombosis (4).

Un mecanismo fundamental para que se produzca la agregación plaquetaria es el incremento de calcio en el interior de la plaqueta. El ionóforo de calcio A23187 aumenta el flujo de calcio desde el exterior hasta el interior de la plaqueta consi-

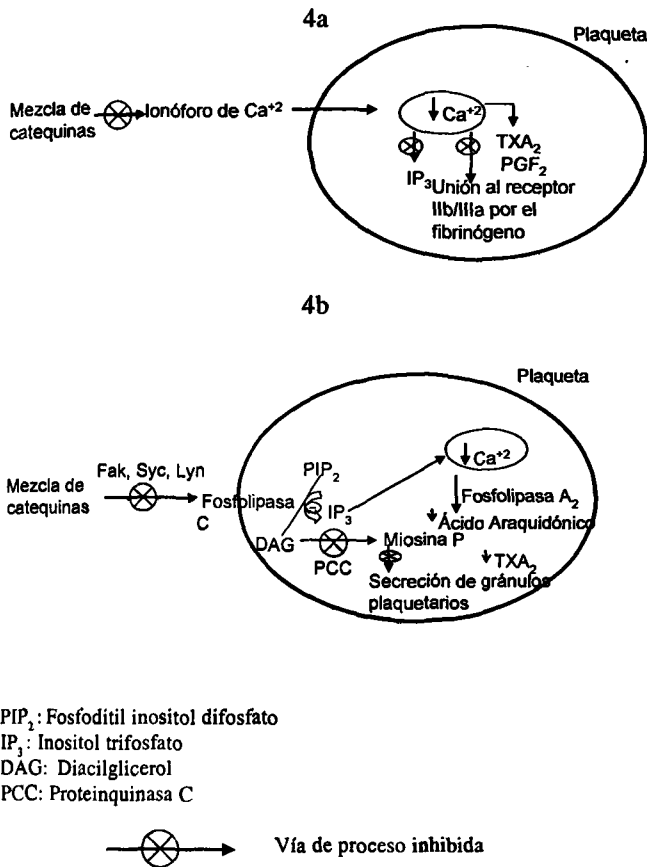
guiendo aumentar la concentración de calcio intracelular. Este aumento conduce a la formación de diferentes endoperóxidos y a la fosforilación de diversas proteínas que son necesarias para que se produzca la agregación (123). Dicho ionóforo es inhibido por la GTC y la EGCG del té verde y su inhibición conduce a una disminución del Ca^{2+} en el interior de la plaqueta (4). Esta disminución trae como consecuencias una inhibición de la formación del inositol trifosfato (IP_3), una inhibición de la unión del fibrinógeno a su receptor plaquetario IIB/IIIA (124) y posiblemente un descenso del tromboxano A_2 (TXA_2) y de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (4), impidiendo todo ello la agregación plaquetaria (4,124) (Figura 4a).

Otro mecanismo proagregante consiste en la fosforilación inducida por la trombina de residuos de tiroxina de proteínas quinasas de las plaquetas (125). La activación de las proteínas quinasas FAK, Syk y Lyn conduce a la fosforilación de proteínas que son necesarias para la activación de la fosfolipasa C, que regula el aumento de calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C, que es necesaria a su vez para la expresión del receptor IIB/IIIA del fibrinógeno (126,127). Diferentes estudios han encontrado una inhibición de la activación de las proteínas quinasas FAK (17), Syk y Lyn (128) por la EGCG del té, lo que conduce a un efecto antiagregante de las plaquetas (17). (Figura 4b). Sin embargo otros han observado una activación de la proteína quinasa Syk, lo que produce el efecto contrario sobre las plaquetas (17).

En estudios in vivo las catequinas del té verde tienen actividad antitrombótica de manera dosis dependiente similar a la aspirina, siendo su porcentaje de protección del 40, 65, 85% a dosis de 10, 50 y 100 mg/kg respectivamente; siendo en el caso concreto de la EGCG del 45,5 y 69,1% a una dosis de 10 y 50g/kg respectivamente. De igual manera, se ha demostrado una prolongación en el tiempo de coagulación similar al de este fármaco (4). También es de interés señalar que las tres catequinas (EGCG, (+)-galato de catequina (CG), ECG) que contienen el grupo galato en la posición tres inhiben de manera importante la agregación plaquetaria; mientras que las catequinas sin este grupo (C, EC) o las catequinas con el

grupo galato en posición dos, no tienen este efecto sobre las plaquetas (17).

FIGURA 4
Posibles mecanismos de acción del las catequinas sobre la agregación plaquetaria



a. Esquema realizado a partir de los datos y conclusiones de Kang et al (4,124).

b. Esquema realizado a partir de los datos y conclusiones de Lill et al (17) y Deana et al (128).

Efectos sobre la presión arterial

No existe prácticamente información bibliográfica contrastada de los efectos de las catequinas sobre la presión arterial. En este sentido, se ha comprobado en un estudio realizado en 218 mujeres de edad avanzada (>70 años) que por cada taza de té consumida, se producía un descenso de 2,2 mmHg en la presión arterial sistólica y 0,9 mmHg en la diastólica, lo que indica que una ingesta regular y a largo plazo de té tendría efectos favorables sobre la tensión arterial (129).

Efectos del té verde y polimorfismo genético

La aplicación de la genética ha supuesto avances muy importantes a la hora de identificar y valorar la calidad de diferentes variedades de té (130). Además la respuesta a las catequinas del té es diferente en unos individuos de otros, sugiriendo que debe hablarse de individuos hipo e hiperrespondedores. Este aspecto ya ha sido comentado para el colesterol y la grasa dietética (131), y tiene su origen, muy posiblemente, en la existencia de polimorfismos genéticos (132). Al igual que ocurre con la ingesta de café y en particular de sus dos diterpenos (Cafestol y Kahweol) (133), la relación dosis-respuesta del té podría estar a su vez condicionada por variantes genéticas (I) de la Apo AIV y la proteína ligante intestinal de ácidos grasos (IFABP) que modulan la absorción de grasa y colesterol, (II) de la actividad del enzima acil-CoA-colesterol-acil-transferasa (ACAT) o (III) de mecanismos relacionados con el transporte retrógrado de colesterol debido a mutaciones en los genes que codifican entre otras a la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la transferasa de grupos acilos desde la lecitina al colesterol (LCAT), etc.

Muy recientemente se ha propuesto que la EGCG modifica la expresión génica mediada por H₂O₂, que a su vez modula la concentración de multitud de proteínas (134). También se ha señalado que los polifenoles del té ejercen unos efectos inhibitorios del desarrollo de la lesión aterosclerótica a través de inhibir genes codificantes para PPAR-gamma, CD36, LXR-alpha, C-myc y estimular genes codificantes para LDL-R y PPAR-alpha a nivel transcripcional (135).

Futuras investigaciones

A la vista de los estudios revisados, creemos que es necesaria la realización de más investigaciones bien controladas sobre el té verde y/o sus flavonoides usando marcadores de enfermedad cardiovascular tales como la disfunción endotelial o el grado de progresión y/o regresión de la placa aterosclerótica, tanto en hombres como en mujeres (136,137). Además es necesario determinar cuál de estos polifenoles, solos o en combinación, son necesarios para reducir la formación de la estría grasa en modelos animales (138).

Con respecto al papel del té sobre el control de peso corporal, es necesario usar los componentes purificados para identificar los componentes activos que le confieren al té dicha propiedad; así como, elucidar los efectos de la EGCG a largo plazo sobre el balance energético y la utilización de sustratos termogénicos en modelos animales y humanos (43). Los ensayos deben programarse a largo plazo y por tanto con ingestas crónicas.

El té verde muestra gran variedad de acciones sobre las plaquetas humanas. Muchos mecanismos pueden contribuir a los efectos beneficiosos de las catequinas en la aterosclerosis, como por ejemplo la inhibición de la función plaquetaria por parte de estas catequinas. Al haberse encontrado un efecto

activador de la EGCG sobre la fosforilación de residuos de tiroxina de proteínas quinasas que produce un aumento de la agregación plaquetaria, hace que sea necesaria la realización de más estudios sobre el té verde o las catequinas aisladas antes de recomendar definitivamente su empleo en la prevención o en el tratamiento de la aterosclerosis (17).

También se deben realizar más estudios sobre interacción con alimentos, biodisponibilidad, concentración alcanzada en los diferentes tejidos y capacidad antioxidante in vivo de las catequinas del té verde y sus metabolitos (111), así como estudios para establecer su actividad antioxidante sobre el colesterol en animales de experimentación. También deben investigarse estos efectos en las formas de catequinas sintéticas conjugadas, porque la actividad secuestrante de radicales libres de estas sustancias es diferentes dependiendo de la posición sustituida en la molécula (91,101).

En cuanto a los oxipolímeros derivados de las catequinas del té verde, se debe estudiar su estructura de forma más precisa y la relación de ésta con el mecanismo antioxidante de los mismos (139) y los riesgos potenciales del consumo de té conteniendo catequinas oxidadas.

Además es importante tener en cuenta los efectos adversos potenciales derivados del uso del té verde o de sus catequinas. Por ejemplo, los efectos sobre el sistema endocrino y sus consecuencias en mujeres embarazadas y niños (1). En este sentido, investigaciones recientes han demostrado que inyecciones intraperitoneales de EGCG producen cambios significativos en varios parámetros endocrinos. Después de haber realizado una administración de este tipo a ratas durante siete días, los niveles de testosterona disminuyeron aproximadamente un 75% en machos y los de 17 β -estradiol un 34% en hembras. Además, en los machos, el peso de los órganos sensibles a andrógenos se redujo 50-70% y en las hembras el peso de los órganos sensibles a estrógenos, aproximadamente un 50%. Por tanto, las variaciones en el peso de los órganos sexuales son catequino-dependientes, mostrando la EGCG el mayor efecto y además dichas variaciones revierten al administrar hormonas sexuales de forma exógena (51).

En cuanto a la presión arterial, que es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular bien establecido (36) y en cuyo desarrollo el estrés oxidativo parece jugar un papel muy importante (140), se deben realizar más estudios sobre el consumo a largo plazo de té verde ya que éste, rico en sustancias antioxidantes, podría disminuir el daño oxidativo que eleva la presión arterial (141).

Por último, la búsqueda de genes candidatos que expliquen la variabilidad de respuesta interindividual al consumo de té es un tema científico de indiscutible futuro e importancia.

CONCLUSION

Los estudios revisados sugieren que un consumo superior a 7 tazas de té verde al día (3,5 g de catequinas diarias) sería una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares, siempre que su consumo se realice en el marco de un ambiente correcto donde dieta y ejercicio sean equilibrados y correctos.

Estos resultados apoyan lo expuesto hace ya muchas centurias por el monje Esai: "El té es una medicina milagrosa para mantener la salud. El té tiene un extraordinario poder para prolongar la vida. En cualquier lugar donde una persona cultive té, le seguirá una larga vida" (8).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el Proyecto del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica referencia AGL 2001-2398-C03-03. Agradecemos al curso de Doctorado en Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid "Nutrición y Enfermedades Cardiovasculares" por su contribución en este artículo.

REFERENCIAS

1. Liao S. The medical action of androgens and green tea epigallocatechin gallate. *HKMJ* 2001;7: 369-374.
2. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and green tea in man. *Eur J Clin Nutr* 1996;50: 28-32.
3. Van het Hof KH, der Boer HS, Wiseman SA, Lien N, Westrate JA, Tijburg LB. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr* 1997;66: 261-266.
4. Kang WS, Lim IH, Yuk DY. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thromb Res* 1999;96: 229-237.
5. Valcic S, Burr J, Timmermann B, Liebler D. Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals. *Chem Res Toxicol* 2000;13:801-810.
6. Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* 2001; 131: 2248-2251.
7. Fundación Erosky, 2001. Consultado en www.consumer.es en Mayo, 2004.
8. Oguni I Haray. Green tea has many medicinal activities for preventing disease such as cancer, cardio-vascular diseases and diabetes. Japan: Chunichi-shinbun Nagoya, 1990.
9. Graham NH. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 1992;21: 334-350.
10. Devesa JA. Plantas con semillas. In: Izco J, Barreno E, Burgués M, Costa M, Devesa J, Fernández J, Gallardo T, Llinona X, Salvo E, Talaberas S, Valdes B. Botánica. McGraw-Hill: Madrid; 1997: 379-581.

11. Innatia. Consultado en: www.innatia.com/te/te_verde.php Mayo, 2004.
12. Salazar L. Consultado en: www.nutriinfo.com.ar/pagina/info/teverde.html. Mayo, 2004.
13. Tijburg L, Wiseman S, Meijer G, Weststrate J. Effects of green tea, black tea and dietary lipophylic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis* 1997;135: 37-47.
14. Hodgson JM, Puddey IB, Croft KD, Burke V, Mori VB, Caccetta R, Beilin L. Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. *Am J Clin Nutr* 2000;71: 1103-1107.
15. Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, Kim M, editors. *Chemistry and applications of green tea*. New York: CRC Press, 1997.
16. Liang Y, Ma W, Lu J, Wu Y. Comparison of chemical compositions of *Ilex latifolia* Thunb and *Camellia sinensis* L. *Food Chemistry* 2001;75: 339-343.
17. Lill G, Voit S, Schrör K, Weber AA. Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Letters* 2003;546: 265-270.
18. Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J Agric Food Chem* 2001;49: 5340-5347.
19. Wang H. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high performance liquid chromatography. *Food Research Int* 2001;34: 223-227.
20. Bhagwat S, Beecher GR, Haytowitz DB, Holden JM, Dwyer J, Peterson J, Gebhardt SE, Elridge AL, Agarwal S, Balentine DA. Flavonoid composition of tea: Comparison of black and green teas. *Agricultural Research Service, 2003*. En: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Other/IFT2003_TeaFlav.pdf
21. Chen ZY, Zhu QY, Tsang D, Huang Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J Agric Food Chem* 2001;49: 477-482.
22. Lin YL, Juan IM, Chen YL, Liang YC, Lin JK. Composition of polyphenols in fresh tea leaves and association of their oxygen radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cell. *J Agric Food Chem* 1996;44: 1387-1394.
23. Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Chem* 2003;51: 1864-1873.
24. Stagg GV, Millin DJ. The nutritional and therapeutic value of tea-a review. *J Sci Food Agric* 1975;26: 1439-1459.
25. Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption nutrition health. *J Nutr* 2000;130: 2409-2412.
26. Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: Prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 2000;71: 1698S-1704S.
27. He YH, Kies C. Green and black tea consumption by humans: impact on polyphenol concentrations in feces, blood and urine. *Plant Foods Hum Nutr* 1994;46: 221-229.
28. Yang CS, Chen L, Lee MJ, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epid Bio Prev* 1998;7: 351-354.
29. Yang CS, Lee MJ, Chen L. Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implications in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8: 83-89.
30. Van het Hof KH, Kivits GAA, Weststrate JA, Tijburg LBM. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr* 1998;52: 356-359.
31. Hollman PCH, Gaag M, Mengelers MJB, Trijp JMP, Vries JHM, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad Biol Med* 1996;21: 703-707.
32. Brown PJ, Wright WB. An investigation of the interactions between milk proteins and tea polyphenols. *J Chromatog* 1963;11: 5504-514.
33. Fingl E, Woodbury DM. General principles. In: Goodman LS, Gilman A, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: Macmillan, 1970:24-25.
34. Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Nutrición y obesidad. *Rev Nutr Practica*, 1999, 3: 49-58.
35. Sánchez-Muniz FJ, Varela Gallego P, Bastida Codina S, González Lorenzo JM. Enfermedad cardiovascular. Hipertensión arterial. Dislipemia. En *Cuidados farmacológicos y nutricionales en el paciente de edad avanzada*. Carbajal A y Varela P, editors. Tema 2. Fundación General de la Universidad Complutense 2001: 1-47.
36. Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Fitoterapia en el control del exceso de peso. En *Plantas medicinales en su farmacia. Formación sobre plantas medicinales por el farmacéutico*. Edufarm y Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2000: 37-46.
37. Dulloo A, Duret D, Rohrer D, Girardier L, Mensi N, Fathi M, Chantre P, Vandermander J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Nutr* 1999;70: 1040-1045.
38. Bretón I. ¿Por qué nos hacemos obesos? *Rev Nutr Practica* 2004;6: 9-13.
39. Dulloo AG. Strategies to counteract readjustments towards lower metabolic rates during obesity management. *Nutrition* 1993;9: 366-372.
40. Landsberg L, Young JB. Sympathoadrenal activity and obesity: physiological rationale for the use of adrenergic thermogenic drugs. *Int Obes Relat Metab Disord* 1993;65: S29-S34.
41. Arch JRS, Wilson JB. Prospects for β_3 -adrenoceptor agonists in the treatment of obesity and diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20: 191-199.
42. Liao S, Liang T. Methods and compositions for inhibiting 5 α -reductase activity. US patent 5, 605, 909, 1997.
43. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of obesity by a green tea catechin. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1232-1234.
44. Borchardt RT, Huber JA. Catechol-o-methyltransferase: structure-activity relationship for inhibition by flavonoids. *J Med Chem* 1975;18: 120-122.
45. Palou A. Los genes de la obesidad. *Formación Continuada en Nutrición y Obesidad* 1998;6: 280-298.
46. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L. Potentiation of the thermogenic antiobesity effects of ephedrine by dietary methylxanthines: adenosine antagonism or phosphodiesterase inhibition? *Metabolism*. 1992;41:1 233-41.

47. Dulloo A, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24: 252-258.
48. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L. Tealine and thermogenesis: interactions between polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20: 71-79.
49. Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;44: 93-399.
50. Hollman PCH, Tijburg LBM, Yang CS. Bioavailability of flavonoids from tea. *Crit Rev Food Science Nutr* 1997;37: 719-738.
51. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 2000a;141: 980-987.
52. Watanabe J, Kawabata J, Niki R. Isolation and identification of acetyl-CoA carboxylase inhibitors from green tea (*Camellia sinensis*). *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62: 532-534.
53. Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol- fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1986;32: 613-622.
54. Matsuda H, Chisaka T, Kubomura Y, Yamahara J, Sawada T, Fujimura H, Kimura H. Effects of crude drugs on experimental hypercholesterolemia. Tea and its active principles. *J Ethnopharmacol* 1986;17: 213-224.
55. Ando T, Nishimura T, Matsubayashi A, Ejiri H, Inoue K, Nakayama Y, Uchiyama S, Kakuda T, Mukai I. Effects of tea catechins on cholesterol absorption with exogenously hypercholesterolemic rat (ExHC-Ta). *Bull Kanagawa Dent Coll* 1989;17: 21-23.
56. Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta* 1992;1127: 141-146.
57. Yang TT, Koo MW. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increased in fecal lipid excretion. *Life Sci* 2000;66: 411-423.
58. Löest HB, Noh SK, Koo SI. Green tea extract inhibits the lymphatic absorption of cholesterol and α -tocopherol in ovariectomized rats. *Am Soc Nutr Sci* 2002;132: 1282-1288.
59. Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem* 2003;14: 326-332.
60. Tsubono Y, Tsugane S. Green tea intake in relation to serum lipid levels in middle-aged Japanese men and women. *Ann Epidemiol* 1997;7: 280-284.
61. Tokunaga S, White I, Frost C, Tanaka K, Kono S, Tokudome S, Akamatsu T, Moriyama T, Zakouji H. Green tea consumption and serum lipids and lipoproteins in a population of healthy workers in Japan. *Ann Epidemiol* 2002;12: 157-165.
62. Yang TT, Koo MW. Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacol Res* 1997;35: 505-512.
63. Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2000;151: 357-379.
64. Caniparoli JP, Gains N, Zulauf M. Influence of stigmastanyl phosphorylcholine on the size, mass, and shape of taurocholate/ lecithin/ cholesterol mixed micelles. *Prog Colloid Polym Sci* 1992;89: 268-270.
65. Hashimoto T, Kumazawa S, Nanjo F, Hara Y, Nakayama T. Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63: 2252-2255.
66. Tsuchiya. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology* 1999;59: 34-44.
67. Yokozawa T, Nakawa T, Kitani K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol fed-rats. *J Agric Food Chem* 2002;50: 3549-3552.
68. Chang PT, Fong WP, Cheung YL, Huang Y, Ho WK, Chen ZY. Jasmine green tea epicatechins are hypolipemic in hamsters (*Miscricetus auratus*) fed a high fat diet. *J Nutr* 1999;129: 1094-1101.
69. Juhel C, Armand M, Pafum Y, Rosier C, Vandermander J, Lairon D. Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro. *J Nutr Biochem* 2002;11: 45-51.
70. Chisaka T, Matsuda H, Kuboruma Y, Mochizuki M, Yamahara J, Fujimura H. The effect of crude drugs on experimental hypercholesterolemia: mode of action of (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves. *Chem Pharm Bull* 1988;36: 227-233.
71. Kono S, Shinchi K, Ikeda N, Yanai F, Imanishi K. Green tea consumption and serum lipid profiles: a cross-sectional study in northern Kyushu, Japan. *Prev Med* 1992;21: 526-531.
72. Imai K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ* 1995;310: 693-696.
73. Kono S, Shinchi K, Wakabayashi K, Honjo S, Todoroki I, Sakurai Y, Imanishi K, Nishikawa H, Ogawa S, Katsurada M. Relation of green tea consumption to serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *J Epidemiol* 1996;6: 128-133.
74. Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 1994;308: 367-372.
75. Chen Z, Peto R, Collins R, MacMahon S, Lu J, Li W. Serum cholesterol concentration and coronary disease in a population with low cholesterol concentrations. *BMJ* 1991;303: 276-282.
76. Steinberg DM, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo C, Witztum J. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320: 915-924.
77. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;34: 454-457.
78. Chung KT, Wong TY, Huang YW, Lin Y. Tannis and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998;38: 421-464.
79. Kalkan Yildirim H, Delen Akcay Y, Guvenc U, Yildirim Sozmen E. Protection capacity against low-density lipoprotein oxidation and antioxidant potential of some organic and non-organic wines. *Int J Food Sci Nutr* 2004;55: 351-362.
80. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in the oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13: 341-390.

81. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low-density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141: 1-15.
82. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Bio Soc Trans* 2001;29: 358-362.
83. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91: 2546-2551.
84. Ortega H, Carrero P, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Propiedades antioxidantes del vino y de los flavonoides. In: De Oya M, Garcés C, editors. *Metabolismo lipídico: Sociedad y Colesterol*. Madrid: IDEPSA, 1997:210-214.
85. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272: 20963-20966.
86. Devaraj S, Jialal I. Oxidized low density lipoprotein and atherosclerosis. *Int J Lab Res* 1996;26: 178-184.
87. Sánchez-Muniz FJ, Sánchez-Montero JM. Enzymatic methods for the study of thermally oxidized oils and fats. In: Boskou D, Elmadafa I, editors. *Frying of food*. USA: Technomic Publishing Co, 1999: 105-141.
88. Yang M, Leake D, Rice-Evans A. Non-oxidative modification of native low-density lipoprotein by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J* 1996;316: 377-380.
89. Tanaka K, Iguchi H, Taketani S, Nakata R, Tokumaru S, Sugimoto T, Kojo S. Facile degradation of apolipoprotein B by radical reactions and the presence of cleaved proteins in serum. *J Biochem* 1999;125: 173-176.
90. Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 1994;308: 278-284.
91. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1995;322: 339-346.
92. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biol Med* 1996;21: 895-902.
93. Da Silva EL, Piskula M, Terao J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radical Biol Med* 1998;24: 1209-1216.
94. Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W. ESR study on the structure- antioxidant relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta* 1999;1427: 13-23.
95. Kondo K, Kurihara M, Miyata N, Suzuki T, Toyoda M. Scavenging mechanism of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Radical Biol Med* 1999;27: 855-863.
96. Da Silva PA, Nave JA, Pereira VA. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/ activity relationships. *Bio Pharm* 2003;66: 947- 954.
97. McAnlis GT, McEneny J, Pearce J, Young IS. Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. *Eur J Clin Nutr* 1998;52: 202-206
98. Hodgson JM, Mori TA, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ. In vitro antioxidant activity of black and green tea: effects on lipoprotein oxidation in human serum. *J Sci Food Agric* 1999;79: 561-566.
99. Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Yoshida H, Ayaori M, Nishiwaki M, Yonemura A, Hara Y, Nakamura H. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr* 1997;66: 261-266.
100. Princen HM, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, Blonk C, Tijburg L, Langius J, Meinders A, Pijl H. No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidants levels and on LDL oxidation in smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 833-841.
101. Osada K, Takahashi M, Hoshima S, Nakamura M, Nakamura S, Sugano M. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. *Com Biochem Physio* 2001;128: 153-164.
102. Yamaka N, Oda O, Nagao S. Green tea catechins Duch as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu²⁺ induced low-density lipoprotein in propagation phase. *FEBS Lett* 1997;401: 230-234.
103. Yokozawa T, Dong E. Influence of green tea and its three major components upon low-density lipoprotein oxidation. *Exp Toxic Pathol* 1997;49: 329-335.
104. Miura S, Watanabe J, Sano M, Tomiya T, Osawa T, Hara T, Tomita I. Effects of various natural oxidants on the Cu²⁺-mediated modification of low-density lipoprotein. *Biol Pharm Bull* 1995;18: 1-4.
105. Vinson JA, Dabbagh YH, Serry MM, Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem* 1995;43: 2800-2802.
106. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996;20: 933-956.
107. Ho CT, Chen Q, Shu H, Zhang KQ, Rosen RT. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese Teas. *Prev Med* 1992;21: 520-525.
108. Hashimoto R, Yaita M, Tanaka K, Hara Y, Kojo S. Inhibition of radical reaction of apolipoprotein B-100 and α -tocopherol in human plasma by green tea catechins. *J Agric Food Chem* 2000;48: 6380-6383.
109. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J*. 1998;330: 1173-1178.
110. Liu ZQ, Ma LP, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 2000;106: 53-63.
111. Lotito SB, Fraga CG. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Rad Biol Med* 1998;24: 435-441.
112. Hayakawa F, Kimura T, Maeda T, Fujita M, Sohmiya H, Fujii M, Ando T. DNA cleavage reaction and linolenic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion. *Biochim Biophys Acta* 1997;1336: 123-131.

113. Frei B. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35: 83-98.
114. Kasaoka S, Hase K, Morita T, Kiriya S. Green tea flavonoids inhibit the LDL oxidation in osteogenic disordered rats fed a marginal ascorbic acid in diet. *J Nutr Biochem* 2002;13: 96-102.
115. Miura J, Chiba T, Miura S, Tomita I, Umegaki K, Ikeda M, Tomita T. Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. *J Nutr Biochem* 2000;11: 216-222.
116. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1255-1262.
117. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherosclerosis. *Science* 1991;251: 788-791.
118. Lenardo MJ, Baltimore D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue specific gene control. *Cell* 1989;58: 227-229.
119. Mauri N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92: 1866-1874.
120. Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G, Stangl V. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 2004;316: 659-665.
121. Murase T, Kume N, Hase Y, Shibuya Y, Nishizawa Y, Tokimitsu I, Kita T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappa B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 1412-1420.
122. Di Minno G, Silver MJ. Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 225:57-60.
123. Walker TR, Watson SP. Synergy between Ca²⁺ and protein kinase C is the major factor in determining the level of secretion from human platelets. *Biochem J* 1993;289: 277-282.
124. Kang WS, Chung KH, Chung JH, Lee JY, Park JB, Zhang YH, Yoo HS, Yun YP. Antiplatelet activity of green tea catechins is mediated by inhibition of cytoplasmatic calcium increase. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38: 875-884
125. Sachinidis A, Skach RA, Seul C, Ko Y, Hescheler J, Ahn H, Fingerler J. Inhibition of the PDGF beta-receptor tyrosine phosphorylation and its downstream intracellular signal transduction pathway in rat and human vascular smooth muscle cells by different catechins. *FASEB* 2002;16: 893-895.
126. Watson S, Berlanga O, Best D, Frampton J. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 2000;11: 252-258.
127. Ozdener F, Kunapuli SP, Daniel JL. Carboxyl terminal sequence of human phospholipase Cgamma2. *Platelets* 2001;12: 121-123.
128. Deana R, Turetta L, Donella-Deana A, Dona M, Brunati AM, De Michiel L, Garbisa S. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet signalling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Thromb Haemost* 2003; 89: 866-874.
129. Hodgson JM, Devine A, Puddey IB, Chan SY, Beilin LJ, Prince RL. Tea intake is inversely related to blood pressure in older women. *Asia Pac J Clin Nutr* 2003;12: S18.
130. Kaundun SS, Matsumoto S. Identification of processed Japanese green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP analysis. *J Agric Food Chem*. 2003;51: 1765-1770.
131. Beynen AC, Katan MB, Van Zutphen LF. Hypo- and hyperresponders: individual differences in the response of serum cholesterol concentration to changes in diet. *Adv Lipid Res*. 1987;22: 115-171.
132. Ordovas JM. The quest for cardiovascular health in the genomic era: nutrigenetics and plasma lipoproteins. *Proc Nutr Soc*. 2004; 63:145-152.
133. De Roos B. Metabolic and mechanistic facts regarding the coffee diterpenes cafestol and Kahweol. In: Vaquero P, Garcia-Arias T, Carbajal A, Sánchez-Muniz F, editors. Bioavailability of Micronutrients and Minor Dietary Compounds. *Metabolic and Technological Aspects*. India: Research Signpost, 2003:147-160.
134. Vittal R, Selvanayagam ZE, Sun Y, Hong J, Liu F, Chin KV, Yang CS. Gene expression changes induced by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in human bronchial epithelial 21BES cells analyzed by DNA microarray. *Mol Cancer Ther* 2004;3: 1091-1099.
135. Kaul D, Sikand K, Shukla AR. Effect of green tea polyphenols on the genes with atherosclerotic potential. *Phytother Res* 2004;18: 177-179.
136. Sasazuki S, Kodama H, Yoshimasu K, Liu Y, Washio M, Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, Arai H, Doi Y, Kawano T, Nakagaki O, Takada K, Koyanagi S, Hiyamuta K, Nii T, Shirai K, Ideishi M, Arakawa K, Mohri M, Takeshita A. Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Ann Epidemiol* 2000;10: 401-408.
137. Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean ME. Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM* 2001;94: 277-282.
138. Crawford RS, Kirk EA, Rosenfeld ME, LeBoeuf RC, Chait A. Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 1506-1513.
139. Li M, Xie B. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxipolymers. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 6362-6366.
140. Portaluppi F, Boari B, Manfredini R. Oxidative stress in essential hypertension. *Curr Pharm Des* 2004;10: 1695-1698.
141. Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2004 ;134: 38-42.

Recibido:16-07-2004

Aceptado: 24-01-2005

Hospital food handlers in Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Ana Eliza Port Lourenço, Claudia Maria Antunes Uchoa. Otilio Machado Pereira Bastos

Instituto Biomédico, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, Brazil

SUMMARY. A survey for intestinal parasites was carried out with food handlers from two private and three public hospitals in Niterói City, RJ, Brazil. The aim of this research was to verify the enteroparasites prevalence in this professional group. The investigation was divided in two phases. The first phase consisted of interviews with the participants; coproparasitological exams using Lutz, Faust et al. and Baermann techniques; under fingernail material analysis, using Mello et al. modified method; and educational lectures to food handlers. In the second phase, coproparasitological exams were repeated. Positive results were observed in 14.2% (17/120) and 17.1% (12/70) of the individuals in the first and second phases respectively. The most frequent parasite was *Entamoeba coli*, detected in 48.5% (16/33) of the samples with positive results. Under fingernail residues were observed in 19.2% (23/120) of the food handlers. *E. coli* cysts were found in one fingernail residue, likewise they were detected in the feces of the same food handler. Such data showed a potential transmission risk of intestinal parasites by food handling, indicating the need of adopting a diagnosis/orientation procedure as a bi-annual routine activity in hospitals, in order to improve the food service quality and population health condition.

Key words: Intestinal parasite, food handler and fingernail material.

RESUMEN. Manipuladores de alimentos de hospitales de Niterói, RJ, Brasil: parasitismo intestinal. Fueron estudiados manipuladores de alimentos de dos hospitales particulares y tres públicos del Ayuntamiento de Niterói, RJ, Brasil, con el objetivo de verificar el predominio de enteroparásitos. Esta investigación fue desarrollada en dos etapas. En la primera se realizó una entrevista; exámenes coproparasitológicos a través de las técnicas de Lutz, Faust et al. y Baermann; análisis del material subungueal por el método de Mello et al. Modificado y fueron ofrecidas charlas educativas a los manipuladores. En la segunda etapa, fueron repetidos los exámenes coproparasitológicos. Se observó parásitos en 14,2% (17/120) y 17,1% (12/70) de las muestras fecales, respectivamente en la primera y la segunda etapas. El parásito más frecuente fue *Entamoeba coli*, evidenciado en 48,5% (16/33) de las muestras positivas. En 19,2% (23/120) de los manipuladores fue observado la presencia de residuo subungueal, siendo evidenciados quistes de *E. coli* en una muestra, igualmente encontrados en las deposiciones de este portador. Este dato demostró el alto potencial de contaminación de alimentos a través del manipulador. Esto sugiere la necesidad de tornar el procedimiento diagnóstico/orientación como una actividad de rutina semestral obligatoria dentro de los hospitales, encaminado a mejorar la calidad de los servicios prestados y las condiciones de salud de la población. **Palabras clave:** Parásito intestinal, manipulador de alimento y material subungueal.

INTRODUCTION

At the moment, Brazil is living a period of epidemiological transition. A gradual increase of chronic-degenerative diseases has been observed in its population, but simultaneously there is a high prevalence of infectious diseases caused by parasites in most cities of the country (1). For this reason researches on intestinal parasites are of great importance to the ethiological identification and the necessary information for treatment and infection control (2).

The intestinal parasitic transmission usually occurs due to a passive oral mechanism of cysts and eggs ingestion, mainly through water, food or hands contaminated by human faecal residues (3). Some intestinal parasites, after contaminating the human cutaneous surfaces or being eliminated in the environment, are in condition to infect another carrier or determine external self-infection (4).

Food handling is relevant to epidemiological study of

intestinal parasites considering that parasitic structures of human faeces can contaminate food directly in the planting area, or by handling. There is a potential transmission risk of intestinal parasites by food handling, indicating the importance of hygienic procedures to prevent other individuals' infection. Hospitalized patients, eventually in immunodeficiency condition just after a surgical procedure and/or recovering from transplantation, may present a greater susceptibility to enteroparasitic infection (5), justifying the importance of a proper food handling in the hospital environment.

The aim of this study was to verify, by coproparasitological diagnosis and under fingernail material analysis, the prevalence of intestinal parasites in food handlers of hospitals, as well as to treat these professionals and give them some health orientation. Furthermore, this study should improve, not only the performance of Food Service Units, but also the health of the food handlers themselves.

METHODS AND MATERIAL

A survey for intestinal parasitic prevalence was carried out with 140 food handlers, volunteers from five hospitals in Niterói City, Rio de Janeiro State, Brazil: two private hospitals (A and B) and three governmental institutions (C, D and E). This study included different professional categories such as nutritionists, serving maids, cooks and auxiliaries, without considering differences in sex or age. The Ethical Research Committee from the University Teaching Hospital "Antonio Pedro", in its Medical Science Center (CEP, CCM/HUAP n.43/01), approved this project in June 20, 2001.

The survey was divided in two phases. During the first phase, three stool samples were collected from each individual in three separate days, using 25g containers. Two containers had Railliet & Henry (6) preservative solution, being the feces processed by Faust et al. (7) and Lutz (8) methods. One container was used to collect fresh samples, being processed by Baermann (9) method and, if diarrheas, by direct exam for detecting possible intestinal protozoan trophozoites. Material under the workers' fingernails was processed by Mello et al. (10) method, modified by Lourenço, Uchôa & Bastos (11).

Personal interviews were held with the workers to obtain personal data and information about sanitary conditions and sewage system in their houses. The Nutrition/Production section chief also reported information about its work environment and daily service routine. Lectures, including group discussions, were given and the workers also received pamphlets explaining proper food handling, general hygiene and health care.

A proper treatment was indicated and specific drugs were given to each individual who presented positive results to pathogenic agents. Metronidazol and Albendazol were respectively the drugs used for protozoa and nemathelminthe infection. Two weeks after the worker reported the treatment completion, his coproparasitological exam was repeated to verify the therapeutic effectiveness.

The second phase, which included new food handlers that did not participate before, started four months after the first phase was over. All previous information was reviewed and coproparasitological exams were repeated. The under fingernail material was analyzed again, however only for employees that presented positive results in the latest coproparasitological exams. The same treatment procedure was adopted in this phase.

To evaluate the significance of the results, the statistical analysis included: arithmetic average, standard deviation, minimum value, maximum value and frequency distribution. The non-parametric "chi-square" test (X^2) and Fisher's exact test (Fisher) were used for variable association. The 5% probability significance level ($p < 0.05$) was applied according to Rodrigues (12).

RESULTS

The employees' participation rate (Table 1) reached 65.2% (120/184) and 56.9% (90/158) in the first and second phases respectively, being irrelevant the reduction observed ($p > 0.05$). There was no significant difference of participation rate between private and public hospitals ($p > 0.05$). In the first phase, 120 workers were examined. In the second, 70 workers had the exams repeated and 20 new participants were also examined. A total of 140 workers participated in the study, though factors as discharge, shifts, or holiday periods caused variation in the number of handlers between the two phases.

TABLE 1
Food handlers participation rate during 1st and 2nd phases of the study in private and public hospitals of Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Hospital	1 st Phase		2 nd Phase		
	Number of Workers	Participating in the study (%)	Number of workers	Participating in the study (%)	
Private	A	53	32 (60.4)	53	27 (50.9)
	B	12	11 (91.6)	8	8 (100)
	Total	65	43 (66.2)	61	35 (57.4)
Public	C	27	19 (70.4)	27	19 (70.4)
	D	48	31 (64.6)	48	24 (50.0)
	E	44	27 (61.4)	22	12 (54.5)
	Total	119	77 (64.7)	97	55 (56.7)
Total	184	120 (65.2)	158	90 (56.9)	

Note: A and B = private hospitals; C, D and E = public hospitals

Between the phases: $X^2 = 2.1085$; $p = 0.1465$

Between private and public hospitals: $X^2 = 0.0009$; $p = 0.9758$

The employees' age (Table 2) varied between 20 and 65 years (average + standard deviation, 36.5 + 9.63 years), being 75.7% women. Most of the workers (79.3%) were living in urban regions, with adequate sanitation and sewage system (Table 3). And 30.8% (43/140) reported an unsatisfactory frequency in taking coproparasitological exams (Table 4).

TABLE 2
Frequency according to sex and age of 140 food handlers of the study in hospitals of Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Sex	Age				Total (%)
	20 to 30	31 to 40	41 to 50	51 to 65	
Male	17	14	1	2	34 (24.3)
Female	23	40	35	8	106 (75.7)
Total	40	54	36	10	140 (100)

(Average ± standard deviation, 36.5 ± 9.63 years).

TABLE 3
Distribution of coproparasitological exam results according to basic sanitary conditions of hospital food handlers' residences in Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Results	Basic sanitary condition of their home places				Total (100 %)
	There is only sewerage (%)	There is only water-works (%)	There is none (%)	There are both (%)	
Positive	4 (14.8)	3 (11.1)	1 (3.7)	19 (70.3)	27
Negative	8 (7.0)	11 (9.7)	2 (1.7)	92 (81.4)	113
Total	12 (8.6)	14 (10.0)	3 (2.1)	111 (79.3)	140

Note: cesspools were considered without sewerage; wells and/or water tank tracks were considered without water-works.

In the first and second phases, positive results were observed in 14.2% (17/120) and 17.1% (12/70) of the individuals respectively (Table 5), being irrelevant the increase observed ($p > 0.05$). Considering only the group of 70 food handlers that participated in both study phases, there was no significant difference of intestinal parasites prevalence ($p > 0.05$). The difference observed in the positive results between private and public hospitals was no significant in both study phases ($p > 0.05$). The 20 handlers added in the second phase, including new hired and senior employees, had their exams observed apart.

TABLE 4
Frequency in taking coproparasitological exams, concerning 140 food handlers from hospitals of Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Frequency of coproparasitological exams		Positive (%)	Results Negative (%)	Total (%)	
Satisfactory	At least once a year	8 (29.6)	42 (37.1)	50 (35.7)	97 (69.2)
	Within a time between 1 to 5 years	7 (25.9)	40 (35.3)	47 (33.6)	
Unsatisfactory	Within a time between 5 to 10 years	5 (18.5)	13 (11.5)	18 (12.9)	43 (30.8)
	For more than 10 years; only in childhood or never	7 (25.9)	18 (15.9)	25 (17.9)	
	Total (100%)	27	113	140	

TABLE 5
Results of food handlers' coproparasitological exams during the two phases of the study in private and public hospitals of Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Hospital		1 st phase Food-handlers			2 nd phase Food-handlers		
		Positive (%)	Negative (%)	Total (100%)	Positive (%)	Negative (%)	Total (100%)
private	A	3 (9.4)	29 (90.6)	32	3 (14.3)	18 (85.7)	21
	B	2 (18.2)	9 (81.8)	11	1 (16.7)	5 (83.3)	6
	total	5 (11.6)	38 (88.4)	43	4 (14.8)	23 (85.2)	27
public	C	4 (21.1)	15 (78.9)	19	1 (6.7)	14 (93.3)	15
	D	4 (12.9)	27 (87.1)	31	3 (17.6)	14 (82.4)	17
	E	4 (14.8)	23 (85.2)	27	4 (36.4)	7 (63.6)	11
	total	12 (15.6)	65 (84.4)	77	8 (18.6)	35 (81.4)	43
Total		17 (14.2)	103 (85.8)	120	12 (17.1)	58 (82.9)	70

Note: A and B = private hospitals; C, D and E = public hospitals

Between the phases: $X^2 = 0.1164$; $p = 0.733$ Between private and public hospitals: $X^2 = 0.2453$; $p = 0.6204$

E. coli was the most frequent parasite, detected in 48.5% (16/33) of the samples with positive results (Table 6). It was followed by *Endolimax nana* and *E. histolytica*, detected respectively in 24.2% (8/33) and 18.2% (6/33). Polyparasitism was detected in 3 samples (3/17) in the first phase (17.6%) and in 2 samples (2/16) in the second phase (12.5%). Among 33 positive feces samples, 12 cases needed parasitic treatment. The effectiveness of treatment could be confirmed in 100% (12/12) of the cases.

TABLE 6
Parasite species found in 33 positive feces samples of 140 food handlers from hospitals of Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Parasite species	Number of parasite detections	
	Total (%)	% In 33 positive feces samples
<i>Entamoeba coli</i>	16 (11.4)	48.5
<i>Endolimax nana</i>	8 (5.7)	24.2
<i>Entamoeba histolytica</i>	6 (4.3)	18.2
<i>Giardia lamblia</i>	4 (2.9)	12.1
<i>Blastocystis hominis</i>	4 (2.9)	12.1
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 (0.7)	3.0
<i>Trichuris trichiura</i>	1 (0.7)	3.0
Ancilostomídeo	1 (0.7)	3.0

Note: no excluding data

Under fingernail residue was observed in 19.2% (23/120) of the handlers (Table 7) and was found most frequently in male workers ($p < 0.05$). The association between under fingernail residue presence and positive coproparasitological results was significant ($p < 0.05$). *E. coli* cysts were detected in one of the 23 under fingernail samples, likewise they were found in the feces of the same handler.

TABLE 7
Analysis of under fingernail residue according to sex and coproparasitological exams of 120 food handlers from hospitals of Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism

Under fingernail residue	Sex		Coproparasitological Exams		Total (%)
	Female	Male	Positive	Negative	
Absent (%)	78 (86.7)	19 (63.3)	10 (58.8)	87 (84.5)	97 (80.8)
Present (%)	12 (13.3)	11 (36.7)	7 (41.2)	16 (15.5)	23 (19.2)
Total (100%)	90	30	17	103	120

Sex variable: $X^2 = 6.4724$; $p = 0.01096$
Coproparasitological Exams: Fisher, $p = 0.02063$; Odds Ratio = 3.75; 95% Confidence Interval = [1.0499; 12.9245].

DISCUSSION

The positive results rate in the food handlers' exams can be considered small if compared to the results of 62.1% in Arias et al. (3) and of 47.1% in Costa Cruz, Cardoso & Marques (13). However, the intestinal parasitic infection in hospital food handlers should not exist, considering the kind of work that such professionals perform and the usual immunodeficiency of people they attend. During the second phase of study, new parasitic cases were found in employees that were not infected in the first phase. Individuals who had completed the treatment after the diagnosis in the first phase had recurrent infections and there was an alternation of ethiological infection agents in these workers between the two phases. Such data denoted a high level of parasitic exchange in the environment those workers live and/or mistakes in basic procedures for controlling oral-fecal transmission of intestinal parasites.

Costa Cruz, Cardoso & Marques (13) have also noticed in the State of Minas Gerais elementary schools, a high frequency of single parasites in relation to carriers with two or more species. Arias et al. (3), studying hospital food handlers in Chile, reported a high frequency of *E. nana* (46.6%), followed by *E. coli* (41.2%) and *Entamoeba histolytica* (12.1%). Also examining food handlers in Chile, Reyes; Olea & Hernandez (14) and Dall'Orso et al. (15) detected *E. coli* as the most frequent parasite, being present respectively in 25.2% (27/110) and 59.3% (100/169) of the stool samples.

Most of the examined individuals lived on the outskirts of Niterói City or in small towns nearby. Many times they reported a close family relationship among workers of different hospitals. This homogeneity among employees from the five hospitals can possibly justify the irrelevant relation between enteroparasites presence and the fact of samples being from private or public institutions. However, Nutrition/Production sections of the five hospitals differed in their service routine and work environment; and one private hospital presented less satisfactory conditions than the public institutions.

The low level of parasitic infections observed in the present study can be explained by the existence of basic sanitary conditions and sewage system in the majority of the employees' residences. During the time between the first and second phases, a sewage system was built in one worker's house. This handler presented positive results only in his first exams what coincided with the period without a system in his house. Ludwig et al. (16) reported a decrease in enteroparasites in Assis, São Paulo State, between 1990 and 1992, the same period of the public sewage system expansion in that region.

The amount of under fingernail residue found in the group was small probably because the material was collected during the work routine and during only one day. Despite showing the service reality, the collect procedure might have con-

cealed hygienic nails caring mistakes due to tasks performed by the worker before the collecting moment, as activities with water, that were not considered. Therefore, it would be more advisable to collect the fingernail material in different days and also in different hours, if possible. Although increasing the volunteer participation, to collect the under fingernail residue by scraping instead of cutting the nails, as it had been suggested by Mello et al. (10), might have made some difference in the small amount of material collected.

The ingestion of parasitic cysts and/or eggs can occur through contaminated hands (3) and there is usually a direct relation between the presence of enteroparasites under the fingernails and mistakes concerning personal hygiene at the defecation moment. So the association between under fingernail residue presence and positive coproparasitological results suggests that incorrect hygienic practices with fingernails may have increased the probability of intestinal parasitic infection in food handlers group. Cases of hand contamination by the food itself or by sanitary elements such as faucets, toilet handles or cords, toilet seats or doorknobs are seldom met (17). The low number of positive feces samples in this study may have interfered with the probable evidence of enteroparasites in the under fingernail material, making the observation of just one positive result extremely relevant. The presence of *E. coli* cysts in under fingernail material, although being a not pathogenic agent, indicated human feces contamination and showed the potential transmission risk of intestinal parasites by food handling.

Goulart et al. (18) and Mello et al. (10) examined under fingernail residue from elementary school students and they found infecting forms of amoeboides, *Giardia lamblia*, *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. Guilheme et al. (19) examined 49 vegetable producers in Maringá, Paraná State, and found 3 positive results for *E. coli*. Similarly Lourenço; Uchoa & Bastos (11), by observing under fingernail material from food handlers in Niterói hospitals, found 2 samples (5.4%) with positive results for *E. histolytica* among 37 samples examined and also detected correspondence in the coproparasitological results.

Torres et al. (20 and 21) did not consider expressive the role of food handlers in *E. histolytica* and *G. lamblia* transmission when they evaluated the presence of such pathogens in servant-maids and day-care children in São Paulo City, Brazil. However, Jonnalagadda & Bhat (22) evidenced enteroparasites eggs and cysts in the food handlers' hand washing water, and on vegetables. As the water was previously free of these agents, that study emphasizes the relevance of handling as a mean of intestinal parasites transmission and the importance of a proper orientation to professionals, especially those who deal with food that is not going to be cooked after handling. The higher frequency of under fingernail resi-

due in male workers can suggest the necessity of a specific orientation to this group.

The Brazilian Ministry of Health - MS (23) stands medical and laboratorial exams as an obligation for all workers in the feeding area. However, 17.9% (25/140) of the professionals interviewed during the study informed they had taken coproparasitological exams approximately ten years ago or when they were little children or that they had never been examined before, even though they have been working as food handlers for many years. This information indicates the need of a specific law on the subject to rule and control workers' exams, considering that health condition of individuals working with food production exerts a direct influence on food quality (24).

In São Paulo State, Brazil, there is an obligation of yearly coproparasitological exams for food handlers (25), based on NR-7 (Regulation Norm) of Ministry of Labor - MT (26). The City Sanitary Code of São Paulo defines a six-month revision time for exams (27). The results of the present study confirm the necessity of bi-annual exams, once workers' infection or re-infection happened in a period of four months. Periodical exams for human carriers' diagnosis are essential to prevent oral-faecal transmission of intestinal parasites (28). Besides becoming a proper treatment possible, the parasitic diagnosis can minimize the non-symptomatic carriers, which largely increase transmission possibilities.

Continuous training under proper food handling techniques, an educational orientation about specific tasks and an alert to the professionals' responsibilities can bring changes in attitude and become an infection control procedure (29 and 24). Nevertheless, only in hospitals A and E the workers had received frequent training or orientations about handling practices, food process, general hygiene and health. The food handlers who were included only in the second phase of this study reported that the orientation lectures they had, made them much more interested in participating. This fact denotes that even being a single procedure, the educative action has done some good to alert the workers to the subject importance.

According to the observations, it seems necessary to enforce standard service procedures to be followed by all hospitals in order to improve food handlers' health and the quality of food service, regardless of being a private or a governmental institution. The results also indicated the necessity of a specific rule in relation to periodic lectures and classes to handlers about satisfactory food handling, with the objective of teaching theory and correct practices of hygienic care of hands and fingernails.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks the hospital workers whose participation made possible this study to be accomplished and to the professionals from Parasitology Laboratory – UFF for their important support and incentive.

REFERENCES

1. Marchioni DML, Zaccarelli EM. Transição Nutricional. *Higiene Alimentar* 2002; 16 (96):19-22.
2. Corey G, Ferreccio C, Garcia J, Maldonado A, Schenone H, Flores B. Estudio epidemiológico em manipuladores de alimentos del Servicio de Salud San Felipe-Los Andes. *Boletín del Instituto de Salud Pública de Chile* 1983; 24(1-2).
3. Arias B, Soto E, Sepúlveda L, Herrera A. Infecciones intestinales por parásitos y/o comensales en manipuladores de alimentos de hospitales del sector norte de Santiago, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología* 1987; 42: 84-86.
4. Sousa MRP, Costêlha SS, Oliveira VM. Helmintoses com relevância em Saúde Pública, transmissíveis através da água e dos alimentos. *Higiene Alimentar* 2001; 15(90-91): 19-24.
5. Robinson RD, Murphy EL, Wilks RJ, Neva FA, Terry SI, Hanchard B, Figueroa JP, Blattner WA. Gastrointestinal parasitic infection in healthy jamaican carriers of HTLV-I. *J Trop Med and Hygiene* 1991; 94: 411-415.
6. Goulart EG, Leite IC. Técnicas Helmintológicas. In: Goulart EG, Leite IC, Moraes DS. *Parasitologia e Micologia Humana*. 2nd ed. Cultura Médica;1978. p. 523.
7. Faust EC, D'antoni JS, Odon V, Miller MJ, Perez C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH. A Critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces: preliminary communication. *Ameri J Trop Med* 1938; 18:169-183.
8. Lutz AO. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1919; 11:121-155.
9. Baermann G. Eine einfache -ethode zur Auffindung vor *Ankylostomum* (Nematoden). In: *Larven in Erdproben*. Meded. Geneesk. Laborat. Weltever Feestbundel.1917. p. 41.
10. Mello EBF, Souza Júnior FL, Pádua HB, Campos MS, Tanabe TH. Encontro de ovos de helmintos e de cistos de protozoários intestinais na região subungueal de crianças em idade escolar dos municípios de Diadema e de Bragança Paulista, São Paulo. *Revista de Patologia Tropical* 1978; 7 (1-2): 47-50.
11. Lourenço AEP, Uchôa CMA, Bastos OMP. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos de hospitais da cidade de Niterói, RJ, Brasil. *Higiene Alimentar* 2002; 16 (97):16-21.
12. Rodrigues PC. *Bioestatística*. 3ª ed. Niterói: EDUFF; 2002. p. 329.
13. Costa-Cruz JM, Cardoso MLG, Marques DE. Parasitas intestinais em manipuladores de alimentos de escolas na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1995; 37 (3):191-196, 1995.
14. Reyes H, Olea M, Hernández R. Enteroparasitosis en manipuladores de alimentos del área de salud oriente de Santiago. *Boletín Chileno de Parasitología* 1972; 27:115-116.
15. Dall'orso LM, Pinilla N, Parra G, Bull F. Parásitos y protozoos comensales en manipuladores de alimentos del área central de la ciudad de Concepción, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología* 1975; 30: 30-31.
16. Ludwig KM, Frei F, Alvares Filho F, Ribeiro-Paes JT. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32(5): 547-555.
17. Coelho LMPS, Sobrinho TA, Oliveira SM, Ikegami MT, Yoshizumi AM, Nakamoto AYK, Brotto SA, Felberg S, Maiorano MR. Ovos e larvas de helmintos nos sanitários de pré-escolas municipais de Sorocaba, SP e suas freqüências nas fezes das crianças. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32(6): 647-652.
18. Goulart EG, Silva WRK, Faraco BFC, Moraes DS. Pesquisa de cistos e ovos de enteroparasitas do homem no depósito subungueal. *Revista Brasileira de Medicina* 1966: 465-466.
19. Guilherme ALF, Araújo SM, Falavigna DLM, Pupulim ART, Dias MLGG, Oliveira HS, Maroco E, Fukushigue Y. Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da feira do produtor de Maringá, Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32(4): 405-411.
20. Torres DMAGV, Chief PP, Costa WA, Kudzielics E. Giardíase em creches mantidas pela Prefeitura de São Paulo, SP, Brasil, 1982-1983. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1991; 33 (2):137-42.
21. Torres DMAGV, Chief PP, Costa WA, Velloso SAG, Dias RMDS, Mangini ACS. Infecção por *Entamoeba histolytica* em creches mantidas pela Prefeitura de São Paulo, SP, Brasil, 1982-1983. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 1992; 24 (1):8-10.
22. Jonnalagadda PR, Bhat RV. Parasitic contamination of stored water used for drinking/cooking in Hyderabad. *Southeast Asian J Trop Med and Public Health* 1995; 26(4): 789-794.
23. Brasil. Portaria 1428 do Ministério da Saúde de 26 de novembro de 1993. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, 1993.
24. Goês JAW, Furtunato DMN, Veloso IS, Santos JM. Capacitação dos manipuladores dos alimentos e a qualidade da alimentação servida. *Higiene Alimentar* 2001; 15(82): 20-22.
25. São Paulo (Estado). Portaria CVS-6, nº 1428 de 26 de novembro de 1993. Constitui o CVS: Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*, 1993.
26. Brasil. Lei nº 6514 do Ministério do Trabalho 22 de dezembro de 1977. Diretrizes sobre segurança e medicina do trabalho. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, 1977.
27. São Paulo (Município). Decreto 25544 de 14 de março de 1988. Constitui o CSM: Código Sanitário Municipal de São Paulo.

28. Gomez Vital MN, Orihuela de la CAL JL, Orihuela de la CAL ME, Fernández Cárdenas N. Parasitismo intestinal em manipuladores de alimentos. *Revista Cuba de Medicina General Integrada* 1999; 15(5): 520-523.
29. Rêgo JC, Guerra NB, Pires EF. Influência do treinamento no controle higiênico-sanitário de unidades de alimentação e nutrição. *Revista de Nutrição da PUCCAMP* 1997; 10(1): 50-62.

Recibido: 27-01-2004

Aceptado: 03-09-2004

Impact of the hypocaloric diet using food substitutes on the body weight and biochemical profile

Mauro Fisberg, Cecilia Lacroix de Oliveira, Isa de Pádua Cintra, Gabriela Losso, Milena Baptista Bueno, Samantha Ottani Rhein, Priscila Maximino

Adolescent Center Federal University of Sao Paulo and Sao Marcos University- Brazil

SUMMARY. Recent studies using balanced hypocaloric diets with food substitutes in some meals, have presented positive results. There are no studies with the Brazilian population on the efficacy of using food substitute, together with a hypocaloric diet. Main objective of this study was to verify the effects of a hypocaloric diet using food substitutes as meal replacement on the body weight, lipid profile, and glucose and insulin plasma levels. Seventy eight subjects of both genders were selected, 20-50 years old, and a body weight index between 25 kg/m² and 35 kg/m². The study lasted for six months and it was divided in 2 phases of three months each- mass reduction for 3 months and 3 months for maintenance. The sample was randomly divided in two groups: Group A (control- 3 months of general nutritional and physical orientation followed by 3 months with 1 meal replacement) and Group B (intervention- 2 meals replacement a day plus nutritional and physical orientation for 3 months followed by 3 months with 1 meal replacement). Anthropometric measurements, percent body fat (%BF), biochemical profile and intake survey were performed at moments 0, 3 and 6 months. Both groups showed a significant decrease in %BF, weight, and consequently in their BMI, in the third and sixth month of follow up. However, weight loss in group B was higher than in group A. At the end of the treatment, 0 and 25.0% of the patients of the group A and B, respectively, presented a weight loss higher than 10% of the initial weight. Comparing the triglycerides, LDL-cholesterol and glucose levels, between the beginning and after the three and six months of treatment, there was a significant reduction in the individuals only in group B. In conclusion, the use of food substitutes as meal replacement, together with a balanced, hypocaloric diet, proved to be efficient in weight loss for Brazilian overweighted individuals.

Key words: Obesity, food substitutes, meal replacement, nutritional orientation.

INTRODUCTION

In the last decades, there was a quick increase in obesity prevalence both in developed and in developing countries (1). In Brazil, there has been a nutritional transition process, and between the years of 1974/75 and 1989, there was a decrease in the prevalence of children malnutrition (from 19.8% to 7.6%) and an increase in obesity prevalence in adults (from 5.7% to 9.6%) (2).

RESUMO. Impacto de dieta hipocalórica utilizando substitutos alimentares sobre o peso corporal e perfil bioquímico. Estudos recentes usando dietas balanceadas e hipocalóricas utilizando substitutos alimentares em algumas refeições têm mostrado resultados positivos. Não existem estudos com a população brasileira sobre a eficiência de substitutos alimentares aliados a dietas hipocalóricas. O objetivo deste estudo foi o de verificar os efeitos desta intervenção com dieta utilizando substitutos alimentares em refeições, sobre o peso corporal, perfil lipídico, e níveis de glicose e insulina. Foram selecionados 78 adultos de 20 a 50 anos, ambos sexos com Índice de Massa Corporal (IMC) entre 25 e 35 kg/m². O estudo teve a duração de seis meses sendo três de intervenção e três de manutenção. A população foi dividida randomicamente em dois grupos: A (controle, que recebeu 3 meses de orientação nutricional e de atividade física e 3 meses de substituto alimentar em uma refeição) e B (intervenção, que recebeu durante 3 meses substituto alimentar em 2 refeições e 3 meses com apenas uma refeição substituída). Análises de consumo alimentar, bioquímica, antropométrica e percentagem de gordura corporal foram realizadas ao início, três e seis meses. Ambos grupos mostraram diminuição significativa do peso corporal, % gordura corporal e IMC aos 3 e 6 meses de intervenção. No entanto o grupo B perdeu significativamente mais peso. Ao final do tratamento, nenhum caso do grupo A e 25% do grupo B, apresentaram perda de peso superior a 10% dos valores iniciais. Em relação aos valores bioquímicos, triacilgliceróis, LDL colesterol e glicose foram significativamente inferiores aos valores iniciais somente para o grupo intervenção. Concluímos que o uso de substitutos alimentares dentro de um plano de redução calórica equilibrada pode ser uma ferramenta eficiente para a perda de peso corporal em adultos brasileiros com excesso de peso.

Palavras chave: Obesidade, sobrepeso, substitutos alimentares, orientação nutricional

Since obesity presents a major association with metabolic changes, such as dislipidemia, hypertension, hyperinsulinemia and glucose intolerance(3-5), it is necessary to implement intervention and prevention measures to fight against that nutritional disorder.

A decrease of 5 to 10% of the initial weight has been shown to be effective in reducing the risk factors for cardiovascular diseases (6).

Changing life style by means of a hypocaloric and balanced

diet, together with physical activity, seems to be the most benefic strategy (7). However, one of the major difficulties in weight loss programs is treatment compliance and long-term weight maintenance.

Recent studies using balanced hypocaloric diets with food substitutes in some meals, have presented positive results concerning those two aspects (8,9). It is believed that those products have, in their formulation, an adequate nutritional composition and that they facilitate the control of calorie intake. There are no studies with the Brazilian population on the efficacy of using food substitute, together with a hypocaloric diet, and its impact on the body weight and metabolic profile of obese individuals.

ABESO, the regional branch of the IOTF (International Obesity Task Force) has presented data showing that in Brazil, 40% of adult population is overweight (19).

Nonetheless, obesity in Brazil is associated with high intake of food and sedentarism, and morbid obesity is not as prevalent as it is in the United States. Regional habits of food intake are, sometimes, maintained, using the traditional combination of rice and beans, meat and salads instead of fast food.

Therefore, the objective of the present study was to verify the effects of a hypocaloric diet using food substitutes on the body weight, lipid profile, and glucose and insulin plasma levels.

MATERIALS AND METHODS

Sample

The researchers selected 78 subjects of both genders (73 women and 5 men), with ages between 20 to 50, and a body mass index ($BMI = \text{Weight (kg)} / \text{Height (m}^2\text{)}$) between 25 kg/m² and 35 kg/m². The subjects were recruited through ads in the magazines and newspapers of the municipality of São Paulo. The study excluded individuals with previous history or presence of chronic diseases, endocrinal, psychiatric disorders, excessive use of alcohol, or under drug or dietetic treatment for weight loss in the last six months, individuals with changes in the lipid profile or lactose intolerant.

The study lasted for six months, and it was divided in 2 phases of three months each. During the first phase, the sample was randomly divided in two groups with similar ages and genders:

Group A: control group, patients were submitted to a hypocaloric diet with nutritional orientation.

Group B: study group, patients were submitted to a hypocaloric diet, with the same calorie amount of the other group, and replacing two meals, a major one (either lunch or dinner) and a small one (breakfast) with a food substitute.

In the second phase, groups A and B were submitted to a

hypocaloric diet, replacing only one meal (either lunch or dinner) with a food substitute.

Patients were assessed as to their lipid profile (total and fraction cholesterol, triglycerides) and as to their glucose and insulin plasma levels, at the beginning, and after three and six months after the beginning of the study.

The study was conducted according to the research regulating guidelines that involve human beings, which are in the CNS Resolutions, on 196/96, approved by the Ethics Committee of the Post Graduation and Research Council of the Federal University of São Paulo, protocol # 1253/02. All participants of the study were volunteers and had their consent inform taken and signed. No financial compensation was established.

Anthropometric evaluation

In order to assess, the body weight a Filizola platform scale was used, with a maximum load of 150 kg and 100 g accuracy. The scale was calibrated before each measurement, and the patients were weighed standing up, with their back to the measurement line of the scale, barefoot, and wearing a minimum amount of clothes, with their arms down and their eyes looking at a fixed point ahead of them to prevent oscillations in the measurement readings (11).

In order to measure their height, a stadiometer was used with an accuracy scale of 0.1 cm. The patient was positioned on the basis of the stadiometer, in an upright position, barefoot, with the upper limbs down at their sides, feet together, trying to make the posterior surface of the heels, pelvic waist, scapular waist, and occipital region touch the measuring scale. A cursor helped to determine the measure that corresponded to the distance between the plantar region and the vortex, being the assessed subject in aspiratory apnea and with the head oriented to the Frankfurt plan parallel to the ground (11).

In order to evaluate the body fat distribution, abdominal circumference was used, measured from the middle point between the last costal arch and the iliac crest, and the hip circumference, measured in the most protuberant side of the glutei (11). Body fat was estimated based on equations to predict body density. From this results % body fat can be calculated. Women body density, was estimated with Jackson et al. (1980) equation (12).

Dietary prescription

Patients were submitted to a dietary program with a meal plan, between 1300 kcal for those with BMI lower than 30 kg/m² and 1500 kcal for those with BMI higher than 30 kg/m². The diet was balanced with 50-55% of carbohydrate, up to 30% of total fat and 20-25% of protein regarding the total energetic value of the diet.

Individualized meal plans were developed with the help of a list of food substitutes, divided in groups and portions

with same calorie amount. Patients were told to have at least 4 to 5 daily meals, to eat larger amounts of food rich in vitamins, minerals, and fibers, such as fruit, vegetables, grains, lean meats and low-fat dairy products and to reduce the intake of saturated fat, fried food, sweets, candies and soft drinks. All the patients had a follow up every fifteen days in an individual appointment with a nutritionist.

The food substitute that was used was a "shake" offered in a liquid form (325 ml per meal) or in powder (33g of powder in 235ml of skim milk), enriched with vitamins and minerals. Nutritional composition of macronutrients is shown in Tables 1 and 2.

TABLE 1
Nutritional composition of the product 33g of powder product added to skim milk

Energy value (kcal)	220
Total fat (g)	2.5
Carbohydrate (g)	40
Protein (g)	10

TABLE 2
Nutritional composition ready-to-feed version product

Energy value (kcal)	200
Total fat (g)	1.5
Carbohydrate (g)	36
Protein (g)	11

Biochemical tests

Total and fraction cholesterol, triglycerides, glucose and insulin were tested at the beginning of the intervention and then after three and six months later.

All the tests were done when patients were fasting for 12 hours. Glucose, total and fraction cholesterol, and triglycerides were analyzed by the colorimetric enzymatic test, whereas insulin was analyzed by electrochemical luminescence.

Statistical analysis

The changes in the value of the anthropometric and biochemical variables, according to treatment group, were assessed by Generalized Estimating Equation (GEE) method (13). T-Student tests were conducted to compare changes of those measurements at each specific time point with the initial value. The test was deemed significant when p value was lower than 0.05. The statistical pack Stata version 7.0 was used for the analysis.

RESULTS

After six months of treatment, 56 subjects continued with the program. Out of the 22 that abandoned the research (all female), 2 became pregnant, 1 moved out of the State and 1 had to go through a major surgery. The demographic, social and economical characteristics and the study group among those who abandoned the study were similar to those of the subjects that remained (data not shown).

Out of the total number of subjects that were in the beginning of the study, 5 were male (3 in group A and 2 in group B). The mean age of the subjects between the control and intervention groups was 35.36 (7.85) and 36.59 (7.31) years, respectively.

Initially, the groups did not present differences as to the anthropometric and biochemical variables. Both groups showed a significant decrease in weight, and consequently in their BMI, in the third and sixth month of follow up. However, weight loss in group B was higher than in group A (Table 3). Upon analyzing the mean values of the waist circumference, it was verified that group A presented a significant reduction only in the sixth month, while group B showed that reduction already in the third month. Fatty mass percentage results, showed only for female group, were significantly reduced for both groups ($p < 0.05$). Group B presented higher reduction of fat, but no clinical or estatistical signifiacnce was achieved.

Figure 1 shows the percentage mean of weight loss according to treatment group. In the first treatment month there was no difference in the percentage of weight loss between the groups. As of the second month, group B presents a more enhanced weight loss. As of the fourth month this difference shows to be significant ($p < 0.05$).

At the end of the treatment, 25.0% of the patients of the group B presented a weight loss higher than 10% of the initial weight, whereas in group A none of the patients presented a percentage of weight loss equal or higher than 10%. In both groups, 35.7% of the patients lost between 5 and 10% of the initial weight and 32.1% of the study group and 50.0% of the control group lost between 0 and 5%. Four patients of group B gained, in average, 1.37% (0.78) and two patients of group A gained, in average 0.75% (0.64).

There was a higher reduction in the biochemical variables in the first three months, in both treatment groups (Table 4). Comparing the triglycerides, LDL-cholesterol and glucose levels, between the beginning and after the three and six months of treatment, there was a significant reduction in the individuals only in group B. It is observed that as to insulin, group B was the only one to present a significant reduction in the third month.

TABLE 3
Mean (SD) changes in anthropometric measures at beginning, after three
and six months of treatment

		Initial	Third Month	Sixth Month
N° of patients	Group A	36	31	28
	Group B	42	36	28
Weight (kg)	Group A	78.11 (11.29)	75.61 (12.91)*	74.62 (12.28)*
	Group B	80.53 (13.34)	74.71 (11.98)*	73.11 (12.93)*
Weight loss (kg) §	Group A	—	-2.72 (2.10)	-3,69 (3.10)
	Group B	—	-4.32 (3.51)	-7,16 (4.85)
IMC (kg/m ²)	Group A	29.77 (3.03)	28.82 (3.36)*	28,42 (3.16)*
	Group B	29.55 (3.20)	27.93 (3.10)*	26,94 (3.12)*
Waist (cm)	Group A	89.96 (11.42)	88.01 (10.31)	86.14 (10.19)*
	Group B	92.31 (11.74)	84.61 (8.82)*	83.41 (9.18)*
Hip (cm)	Group A	108.46 (6.78)	104.51 (7.15)*	104.77 (6.76)*
	Group B	111.39 (7.97)	104.03 (7.79)*	104.03 (8.77)*
Body Fat (%)	Group A	37.57 (5.35)	35.96 (6.25)*	34.80 (6.31)*
	Group B	37.55 (5.52)	33.81 (6.01)*	33.42 (5.37)*

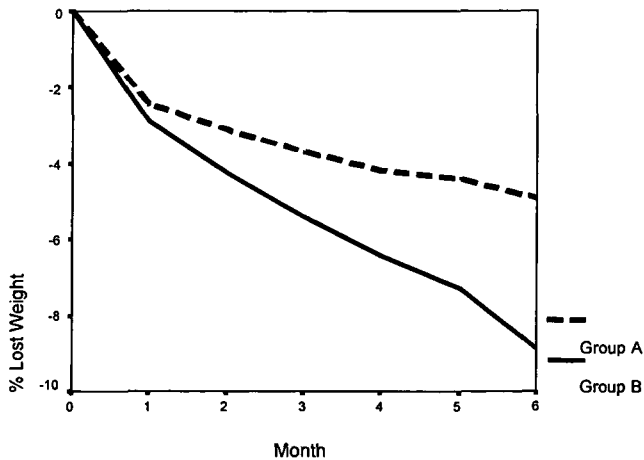
Data are represented by means and standard deviation N(SD). * T-student test compared with first observation.
§ GEE: treatment effect (p<0.001).

TABLE 4
Biochemical measures at beginning, and after three and six months of treatment

		Initial	Third Month	Sixth Month
Cholesterol	Group A	201.53 (43.20)	174.46 (36.04)*	187.96 (33.07)*
	Group B	193.81 (33.03)	168.14 (31.38)*	179.39 (26.79)*
HDL-cholesterol	Group A	53.72 (14.94)	50.71 (13.75)	53.39 (13.60)
	Group B	54.12 (13.40)	49.69 (10.66)*	54.68 (13.26)
LDL-cholesterol	Group A	123.39 (42.20)	107.00 (31.95)*	114.46 (31.38)
	Group B	114.34 (31.05)	99.25 (29.33)*	107.14 (21.36)*
VLDL-cholesterol	Group A	25.61 (15.82)	20.22 (10.25)*	20.11 (9.34)*
	Group B	22.19 (10.26)	17.61 (7.95)*	17.57 (10.50)*
Triglycerides	Group A	117.61 (64.37)	100.83 (51.13)*	101.00 (46.74)
	Group B	110.61 (51.54)	88.19 (39.83)*	87.82 (52.09)*
Glucose	Group A	90.97 (8.91)	84.09 (9.36)*	89.96 (13.39)
	Group B	88.57 (8.54)	84.61 (8.46)	85.10 (7.38)*
Insulin	Group A	10.53 (4.65)	10.21 (5.22)	9.45 (4.23)
	Group B	10.47 (6.52)	7.43 (3.27)*	8.33 (4.60)

Data are represented by means and standard deviation N(SD). * paired t-student test with initial data.

FIGURE 1
Percentage average of initial weight change during 6 months of treatment, in group A (control) and group B (intervention)



There was a significant change of relative loss weight throughout time, in the GEE model ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Obesity treatment, by means of dietetic intervention and physical exercises, not always presented positive results, due to a high rate of individuals that either give up or do not comply with the several treatments. Another aspect that has drawn attention in weight loss programs is the difficulty that many individuals experiment in keeping their weight for a long period (14). This fact seems to be connected to lack of encouragement a low self-esteem.

In the present study, two groups (study and control groups) were followed up for six months. Both received the same dietetic guidance, but the study group was oriented to use a food substitute in the breakfast and in other meal during three months. From the third to the sixth month both groups started to use food substitutes in one of the major meals. It was observed that in the first month of treatment, that both groups presented similar decrease of body mass, an average of 3% of the initial values. It was concluded that all patients were highly motivated and eager to reduce energy intake. After this initial observation, treatment group presented a significant decrease of weight and after three months, this was a two fold decrease as compared to control group: (-2.72 (2.1) x -4.32 (3.5)). As of the second intervention period, the percentage of weight loss was significantly higher in the study group than in the control group (Figure 1). These results confirm those of other studies that evaluated the effect of a hypocaloric diet combined with the use of food substitutes for different periods.

Ditschuneit et al. (8) in a research conducted with a protocol with very similar design as ours, but with larger follow up, showed similar data. The average of weight loss in the first three months in the weight of the group that used food substitute was 7.1 (3.5) kg and in the control group was 1.3 (2.2) kg. An analysis conducted on studies on the efficacy of food substitutes use in weight loss programs showed that individuals that used food substitutes presented a more significant weight loss than those that only had a conventional nutritional guidance, and the average difference was 2.54 to 3.01 kg between the two groups in the first three months (15).

One of the advantages of using food substitutes is the control of caloric intake, once the individual only consumes a certain amount of calories. Another benefit is the composition of those products, because besides vitamins and minerals, they also have fibers that increase the feeling of being satisfied.

The emphasis is the program proposed in this study. Both groups had nutritional follow up every fifteen days, by nutritionists and were encouraged to carry out frequent physical activities. Therefore, the proposal is to adopt a healthy life style, by means of a balanced and hypocaloric diet and physical exercises, using food substitutes.

Upon analyzing the biochemical profile, both groups presented positive results. This can be seen as a result of the significant weight loss, once a weight loss of 5 to 10% of the initial weight is associated with improvement in metabolic profile (16). The difference in the lipid profile between the two groups was that in the study group there was a significant difference between the levels at the beginning and at the end of the six months for triglycerides and LDL-cholesterol, whereas in the control group this difference was observed only in the third month. This result might be a result of the mean values relatively normal of the lipid profile variables presented by both groups at the beginning of the study.

Ditschuneit et al. (17) evaluated the impact of the caloric restriction using food substitute on the lipid profile and verified that there was a significant reduction in triglycerides, only in the group that used food substitute in the third intervention month. The mean weight loss in this group was 7.8 (3.7) % of the initial weight. Another study that evaluated the metabolic profile of individuals that used food substitutes showed that the improvement of the lipid profile took place mainly in those individuals with total cholesterol higher or equal to 220 mg/dL and that presented weight loss of more than 5% of the initial weight (9).

As to insulin, it was verified that the study group was the only one to present a decrease in the mean values in the first three month. This result might be associated to a larger reduction in the waist circumference, also observed in this group, in the third month (control group: -1.95 cm; study group: -7.7 cm). Rice et al. (18) in a study conducted with obese men observed that abdominal fat reduction was critical

to improve sensitivity and reduce insulin plasma levels.

Throughout the study, the only manifestation of side effects that could be associated to product use was a transitory elimination of flatus, which discontinued after two weeks of drug usage. Both in the control and in the study group there was a significant change of life styles, with a gradual increase of physical activity and reduction of body measures. In an individual and qualitative analysis of attitude changes, all the patients mentioned incorporation of new types of food to their diet, reduction in fried food, chocolate and sweets consumption, and, at the same time, they mentioned a major change in the family dynamics. Even with not much significant weight loss, there was a change in the type of clothing, social and sexual activity, with more acceptance by the family and social group, regardless of the analysis group. Nutritional guidance programs, with logistics and situational support for daily situations are essential for those attitude changes

As seen in many developed and developing countries, Brazil is going through a nutritional transition, with a wide increase in obesity prevalence.

Nonetheless, obesity treatment presents high rates of lack of commitment, with patients continually dropping of. Using a food substitute, helping them to daily plan their meals, has proved to be very satisfactory during this study, with a high acceptance of product and of the entire nutritional program.

In conclusion, the use of food substitutes together with a balanced, hypocaloric diet, and the change in food habits proved to be efficient in weight loss for Brazilian, overweighted individuals, being a good alternative for overweight and obesity follow up.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our gratitude to the dietitians that were part of the team throughout the intervention: Samantha Cesar, Samantha Rhein, Maria Aparecida Passos, Sofia Boschetti, Eliana Almeida and Priscila Maximino, for an outstanding job. For our secretary, Luciana Pires. To Unilever Brazil, for giving us the food substitutes, and for Sao Marcos University for the support.

REFERENCES

1. Popkin BM, Doak CM. The obesity epidemic is a world phenomenon. *Nutr Rev* 1998; 56:106-14.
2. Monteiro CA, Mondini L, Medeiros SAL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49:105-113.
3. Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents: a follow-up of the Harvard Growth Study 1922 to 1935. *N Engl J Med* 1992; 327:1350-55.
4. Bao W, Srinivasan SR, Berenson GS. Persistent elevation of plasma insulin Levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. *Circulation* 1996; 93:54-59.
5. Gunnell DJ, Frankel SJ, Nanchahal K, Peters TJ, Smith GD. Childhood obesity and adult cardiovascular mortality: a 57-y follow-up study based on the Boyd Orr cohort. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:1111-18.
6. Willett WC, Dietz WH, Colditz GA. Guidelines for healthy weight (review). *N Engl J Med* 1999; 341:427-34.
7. Van Dale D, Saris WHM, Schoffelen PFM, Ten Hoor F. Does exercise give an additional effect in weight reduction regimens? *Int J Obes* 1987; 11:367-75.
8. Ditschuneit HH, Flechtner-Mors M, Johnson TD, Alder G. Metabolic and weight-loss effects of a long-term dietary intervention in obese patients. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:198-204.
9. Ashley JM, Jeor ST, Schrage JP, Perumean-Chaney SE, Gilbertson MC, McCall NL, Bovee V. Weight Control in the Physician's Office. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1599-604.
10. Brasil – Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde). Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis. Available in <http://www.inca.gov.br> em 27/10/2004.
11. Lohman TG, Roche AF, Martorrel R. Anthropometric Standardization Reference Manual. Champaign, Illinois, Human Kinetics; 1988.
12. Jackson, AS; Pollock, ML, Ward, A. Generalized equations for predicting body density of women. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1980; 12:175-82.
13. Twiski, JWR. Applied longitudinal data analysis for epidemiology practical guide. United Kingdom: Cambridge University Press, 2003.
14. Goodrick GK, Foreyt JP. Why treatments for obesity don't last. *J Am Diet Assoc* 1991; 91: 1243-47.
15. Heymsfield SB, van Mierlo CAJ, van der Knaap HCM, Heo M, Frier HI. Weight management using a meal replacement strategy: meta and pooling analysis from six studies. *Int J Obes* 2003; 27:537-49.
16. Janssen I, Fortier A, Hudson R, Ross R. Effects of an energy-restrictive diet with or without exercise on abdominal fat, intramuscular fat, and metabolic risk factors in obese women. *Diabetes Care* 2002;25:431-38.
17. Ditschuneit HH, Frier HI, Flechtner-Mors M. Lipoprotein responses to weight loss and weight maintenance in high-risk obese subjects. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:264-70.
18. Rice B, Janssen I, Hudson R, Ross R. Effects of aerobic or resistance exercise and/or diet on glucose tolerance and plasma insulin levels in obese men. *Diabetes Care* 1999; 22:684-91.

Recibido: 16-07-2004

Aceptado: 22-12-2004

Excreción urinaria de deoxipiridinolina y su relación con la densidad mineral ósea, el estradiol sérico y los años de postmenopausia en mujeres mexicanas

Rosa Olivia Méndez Estrada y C. Jane Wyatt

Coordinación de Nutrición. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD,A.C.).
Hermosillo, Sonora, México

RESUMEN. La excreción de deoxipiridinolina se relaciona a factores de riesgo asociados a pérdida de masa ósea, como es el caso de la disminución de estrógenos. En el presente trabajo se determinó la excreción de deoxipiridinolina en mujeres mexicanas en etapa postmenopáusica y su asociación con indicadores antropométricos, densidad mineral ósea, calcio y fósforo dietarios, años de postmenopausia y estradiol sérico. La densidad mineral ósea en el antebrazo y en el calcáneo de 47 mujeres de 45 a 63 años se midió utilizando absorciometría dual de rayos X. Para la ingestión de calcio y fósforo se aplicó un registro duplicado de consumo de alimentos de 24 horas. Para la cuantificación del estradiol y de la deoxipiridinolina se utilizó un equipo automático Imx y la técnica de ELISA, respectivamente. El promedio de excreción de deoxipiridinolina fue de $7,27 \pm 5,31$ nM/mM. El 29,8% de los valores individuales rebasaron los límites normales. La deoxipiridinolina se asoció significativamente a estradiol ($r = -0,37$, $p = 0,01$) y a años de postmenopausia ($r = 0,35$, $p = 0,02$), pero no hubo asociación de deoxipiridinolina con peso, talla, densidad mineral ósea, ni con el consumo de calcio y fósforo. En conclusión, alrededor del 30% de las mujeres estudiadas presentaron un valor promedio elevado de deoxipiridinolina. Si se considera la correlación negativa entre la deoxipiridinolina y el estradiol sérico, este segmento de la población puede considerarse en riesgo de pérdida acelerada de masa ósea. La terapia de reemplazo hormonal es importante para prevenir la pérdida acelerada de masa ósea en mujeres en etapa postmenopáusica.

Palabras clave: Deoxipiridinolina; postmenopausia; antropometría; densidad ósea; estradiol.

INTRODUCCION

Los marcadores de actividad ósea son metabolitos producidos durante el proceso de recambio óseo. Su cuantificación se realiza en estudios de investigación para reforzar los resultados obtenidos al medir la masa ósea y para monitorear cambios de actividad ósea al aplicar prácticas de intervención terapéuticas en personas con masa ósea disminuida (1,2). Entre los marcadores utilizados se citan a la osteocalcina, cuya concentración se eleva durante la formación ósea y a los entrecruzadores de colágeno tipo I que se aumentan durante la resorción ósea (3). La deoxipiridinolina (Dpd)

SUMMARY. Relationship of deoxyypyridinoline excretion with bone density, serum estradiol and years of postmenopause in Mexican postmenopausal women. Deoxyypyridinoline is one of the metabolites produced during bone resorption. Deoxyypyridinoline excretion, unlike other markers, is not affected by diet, or the activity level of other tissues. In postmenopausal women, increased excretion of deoxyypyridinoline has been associated with increased bone mass loss. The objective of this study was to determine the association of deoxyypyridinoline excretion in postmenopausal Mexican women with anthropometric factors, bone mass density, calcium and phosphorous intakes, post menopause years and serum levels of estradiol. The concentration of deoxyypyridinoline in 24 h urine was determined utilizing an ELISA technique. An average of $7,27 \pm 5,31$ nM Dpd/mM creatinine was found. A negative correlation between deoxyypyridinoline and serum estradiol levels ($r = -0,37$, $p = 0,01$) was found. Post menopausal years correlated positively ($r = 0,35$, $p = 0,02$) with Dpd. No significant correlation between deoxyypyridinoline and anthropometric data, bone mass density, calcium and phosphorous intakes was found. In conclusion, 30% of the subjects of this study had elevated levels of deoxyypyridinoline excretion and taking into consideration the negative correlation observed with serum estradiol, this segment of the population could be at risk for accelerated bone loss. Hormone replacement is important for post menopausal women to prevent increased bone loss.

Key words: Deoxyypyridinoline, postmenopause, anthropometry, bone density and serum estradiol.

proviene de entrecruzadores de colágeno y a diferencia de otros marcadores de resorción ósea su excreción no se ve afectada por la dieta ni por el grado de actividad de otros tejidos diferentes al hueso (4). Su elevación se observa en los procesos que implican pérdida acelerada de masa ósea como es el caso de mujeres en etapa menopáusica sin terapia de reemplazo hormonal (5-10). La excreción de Dpd también se relaciona directamente a factores de riesgo asociados a pérdida de masa ósea, como es el caso de la disminución de estrógenos. Mazess y Barden (11) mostraron la utilidad de cuantificar marcadores de resorción ósea al reportar que los valores elevados de calcio urinario/creatinina en un grupo de mujeres jóvenes no

correspondían a pérdidas óseas, dado que la excreción del marcador de resorción ósea utilizado no estaba elevada. El objetivo del presente trabajo fue determinar la excreción de Dpd en mujeres mexicanas en etapa postmenopáusica y su asociación con indicadores antropométricos, densidad mineral ósea, calcio (Ca) y fósforo (P) dietarios, años de postmenopausia y estradiol sérico.

MATERIAL Y METODOS

Sujetos

Los detalles referentes a la selección de mujeres, criterios de exclusión, estudios antropométricos, dietarios, densidad mineral ósea y estrógenos fueron reportados por nosotros con anterioridad (12). En resumen, participaron 47 mujeres de 45 a 63 años de edad, quienes tenían al menos un año de haber presentado la menopausia. Se midió el peso y la talla en una balanza (A&D, Japan) y en un estadiómetro portátil (Holtain, UK), respectivamente. En orina de 24 h se determinó creatinina usando un juego de reactivos comercial (Randox Laboratories Ltd., Ardmore UK). Se aplicó un registro duplicado de consumo de alimentos de 24 horas para medir la ingestión dietaria de Ca y P (12). La densidad mineral ósea en antebrazo (DMOb) y en el calcáneo (DMOt) se midió utilizando absorciometría dual de rayos X (PIXI lunar Radiation Corp., Madison, Wisc., USA) y para la cuantificación de estradiol sérico se utilizó un equipo automático Imx (Abbott Laboratories de México). Los criterios de exclusión fueron la presencia de enfermedades (Enfermedad de Cushing's, hiperparatiroidismo, enfermedades renales) y la toma de medicamentos reconocidos por afectar el metabolismo óseo (anticonvulsivos, corticosteroides, tiazidas, tiroxinas) (12).

Determinación de Dpd

La cuantificación de Dpd en orina se realizó utilizando la técnica de ELISA con anticuerpos policlonales antipiridinolina (Metra Biosystems, Inc. Mountain View, CA). La densidad óptica de las muestras se obtuvo en un lector de microplacas Bio-rad Modelo 550 (BIO RAD, Japan), a 405 nm. La concentración de Dpd urinaria se corrigió en base a la excreción de creatinina. El rango de valores normales para mujeres de 25 a 44 años de edad es de 3,0-7,4 nM/mM de acuerdo a los datos reportados por Metra Biosystems (Metra Biosystems, Inc. Mountain View, CA).

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete NCSS 60 (13) para obtener el análisis estadístico descriptivo. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para determinar la asociación entre Dpd y las variables antropométricas, dietarias, años de postmenopausia, DMO y estradiol, ajustando para edad, peso y talla. Los datos

dietarios y de Dpd se transformaron a log considerando que no mostraron distribución normal.

RESULTADOS

La Tabla 1 presenta los datos antropométricos, los años de postmenopausia y los valores de Dpd urinaria de las mujeres participantes en el estudio. Se incluyeron mujeres de 48 a 63 años con un promedio de 55,7 años de edad y 8,6 años de postmenopausia (12). El promedio de Dpd fue de $7,27 \pm 5,31$ nM/mM, encontrándose dentro del rango normal (3,0-7,4 nM/mM) para mujeres de 25 a 44 años de edad, de acuerdo a los datos reportados por Metra Biosystems (Metra Biosystems, Inc. Mountain View, CA). Sin embargo, aproximadamente la tercera parte (29,8%) de los valores individuales rebasaron el límite superior del rango normal.

TABLA 1

Edad, antropometría, años de postmenopausia y excreción urinaria de Dpd en mujeres postmenopáusicas de Hermosillo, Sonora, México (n=47)

Características	Media \pm SD	Rango
Edad, años	55.7 \pm 4.1	48 - 63
Peso, kg	71.7 \pm 10.8	46.6 - 101.2
Talla, m	.6 \pm 0.1	1.5 - 1.7
Años de postmenopausia	8.6 \pm 6.11	1 - 26
Dpd (nM/mM Cr)	7.27 \pm 5.31	0.68 - 30.43

Dpd = Deoxipiridinolina; Cr = Creatinina

La matriz de correlación con los datos de Dpd, antropometría, años de postmenopausia, niveles séricos de estradiol, DMOt, DMOB y Ca y P dietario se muestran en la Tabla 2. El estradiol sérico correlacionó negativamente con Dpd ($r = -0,37$, $p = 0,01$), mientras que los años de postmenopausia mostraron una asociación positiva ($r = 0,35$, $p = 0,02$). Dichas asociaciones no se modificaron al ajustar por peso, talla y edad. No hubo correlación significativa de Dpd con las variables antropométricas, con los valores de densidad ósea en las dos regiones anatómicas estudiadas, ni con el consumo de Ca y P ajustado por energía.

TABLA 2
 Coeficientes de correlación de Spearman entre antropometría, estradiol, densidad mineral ósea, años de postmenopausia, Dpd, fósforo y calcio dietarios¹

	Dpd	P
Edad	0.10	0.50
Peso	0.15	0.31
Talla	-0.10	0.52
Estradiol	-0.37	0.01
DMOt	-0.04	0.78
DMOb	-0.09	0.55
Años Men	0.35	0.02
P	-0.04	0.78
Ca	-0.17	0.27

¹DMOt = Densidad mineral ósea del calcáneo; DMOB = Densidad mineral ósea del antebrazo; Años Men = Años de postmenopausia; Dpd = deoxipiridinolina; P = fósforo dietario; Ca = Calcio dietario.

DISCUSION

La Dpd es un marcador de actividad ósea de elevada especificidad. Vesper et al (2) hicieron varias recomendaciones enfocadas a disminuir la variabilidad de los valores de piridinolina y Dpd. Entre otras sugerencias y coincidiendo con Eastell et al (14), señalaron que la recolección de orina de 24 h ofrece la ventaja de medir la excreción diaria integrada de la Dpd y además permite disminuir la variación intraindividual de la excreción de creatinina. Yu et al (15) cuantificaron Dpd en mujeres premenopáusicas y en postmenopáusicas con y sin terapia de reemplazo hormonal. Sus resultados mostraron valores más elevados en las mujeres postmenopáusicas sin terapia de reemplazo hormonal ($6,82 \pm 1,51$ nM/mM creatinina) al compararlas con las premenopáusicas ($5,37 \pm 0,92$ nM/mM creatinina) y con las postmenopáusicas con terapia hormonal ($4,77 \pm 1,77$ nM/mM creatinina). Pfister et al (16) publicaron niveles de Dpd de $7,43 \pm 2,53$ y $8,91 \pm 4,5$ nM/mM creatinina en mujeres de 41 a 90 años de edad previamente clasificadas como normales y osteoporóticas, respectivamente. En nuestro estudio, el valor medio de Dpd se encuentra dentro del rango normal, sin embargo la tercera parte de los valores individuales superaron los límites normales, indicando que en este grupo de mujeres existe una resorción ósea elevada. La medición de la densidad mineral ósea, clasificó al 37% de las mujeres como osteopénicas (12). Aparici et al (17) reportaron una prevalencia del 31% de resorción ósea acelerada en mujeres climatéricas con 4,5 años de menopausia, utilizando como marcador a la Dpd.

La asociación negativa entre la Dpd y los niveles de estradiol ha sido publicada para mujeres con deficiencias severas de estradiol (18, 19) y en mujeres mayores de 60 años

con disminución gradual de la masa ósea (16). Raisz et al (20) reportaron una reducción en los parámetros de resorción y un aumento en los de formación ósea en mujeres postmenopáusicas tratadas con estrógenos.

En estudios reportados por Gorai et al (21) y por Zittermann et al (22) se sugiere que aún los cambios cíclicos en los niveles de los esteroides sexuales durante el ciclo menstrual de las mujeres jóvenes, pueden provocar variaciones en los marcadores de formación y resorción ósea. En nuestro estudio, la asociación negativa entre Dpd y estradiol ($p = 0,01$) permaneció significativa aún después de ajustar por peso, talla y edad. Por lo tanto, cubrir los niveles séricos de estradiol podría ser una medida preventiva contra la pérdida ósea asociada a los bajos niveles de esta hormona. Sin embargo es importante que antes de iniciar una terapia estrogénica las mujeres conozcan sus riesgos y beneficios y que con esa base consideren iniciar dicha terapia. Entre los efectos benéficos de la terapia estrogénica se señalan, además de la prevención de pérdida de masa ósea, posibles propiedades neuroprotectoras (23), disminución de los niveles de colesterol en mujeres hipercolesterolémicas en etapa postmenopáusica (24) y disminución de los síntomas de la menopausia (25). Por otra parte, Kerlikowske et al (26) calcularon el riesgo relativo de cáncer de pecho en mujeres que participaron en estudios publicados entre 1996 y el 2000 y concluyeron que la probabilidad de cáncer de pecho es mayor cuando la terapia incluye progestina y tiene una duración de cinco años o más. Otros riesgos a la salud que se relacionan con la terapia estrogénica son tromboembolia (27) y enfermedades coronarias del corazón (28).

Las alteraciones en los niveles hormonales y en los marcadores de actividad ósea se observan en mayor o menor proporción durante la menopausia. Garnero et al (29) publicaron que la sola presencia de la menopausia incrementó los niveles de marcadores de formación ósea hasta un 52%, mientras que los de resorción ósea aumentaron hasta un 97% en mujeres con 40 años de postmenopausia. Se señala que dichos incrementos se conservan o se elevan con la edad o con los años de postmenopausia. En el mismo sentido, Eriksen et al (30) manifiestan que la pérdida acelerada de hueso esponjoso durante la postmenopausia es el resultado de una respuesta inadecuada de formación ósea frente a una resorción ósea acelerada.

Otros estudios puntualizaron que la resorción ósea presenta diferentes grados de actividad a través del tiempo de postmenopausia. Iki et al (31) reportaron una pérdida ósea acelerada durante los primeros 10 años posteriores a la menopausia, mientras que de acuerdo a los resultados de Taguchi et al (32) la resorción ósea se incrementa dramáticamente dentro de los primeros cinco años de postmenopausia y permanece elevada en mujeres osteoporóticas. Mazzuoli et al (33) cuantificaron un marcador de formación (fosfatasa

alcalina plasmática) y uno de resorción ósea (hidroxiprolina urinaria) en mujeres pre y postmenopáusicas saludables de 40 a 60 años de edad y concluyeron que aún cuando la resorción ósea supera a la formación en los 2 primeros años de postmenopausia, la formación ósea predomina los siguientes 3 ó 5 años, de tal manera que, en cierta medida, existe una reparación del desequilibrio entre la resorción y la formación ósea. La correlación positiva entre los años de postmenopausia y los niveles de Dpd, en el presente estudio, no se modificó cuando se ajustó por edad, peso y talla.

La falta de correlación entre los valores de densidad ósea y Dpd se puede explicar al considerar que la densidad ósea actual no solo es reflejo de la pérdida registrada durante los años de postmenopausia sino que también lo es de la cantidad de masa ósea alcanzada durante la adolescencia y juventud. Respecto a la relación no significativa entre Dpd y consumo de Ca, Kärkkäinen et al (34) coinciden con nuestro resultado al no encontrar efecto de diferentes dosis de Ca sobre marcadores de formación y resorción ósea, aún cuando ellos reportaron una disminución de la hormona paratiroidea y un aumento de la concentración de calcio sérico ionizado. En cuanto a la relación Dpd-ingesta de P, existen reportes realizados en mujeres (35, 36) y en hombres (37) en los cuales los resultados, al igual que los nuestros, mostraron cambios no significativos en los niveles urinarios de marcadores de resorción ósea frente a ingestas elevadas de fósforo.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron un valor promedio de excreción de Dpd de $7,27 \pm 5,31$ nM/mM en mujeres mexicanas en etapa postmenopáusica. Dicho valor se encuentra dentro del rango normal, sin embargo alrededor de la tercera parte de las mujeres estudiadas podría, en años futuros, ver comprometidos sus valores de masa ósea como efecto de una actividad ósea aumentada. Cubrir los niveles séricos de estradiol, entre otras medidas, ofrecería cierto grado de protección frente a la pérdida ósea asociada a los bajos niveles de esta hormona.

REFERENCIAS

- Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997;30:573-93.
- Vesper H, Demers L, Eastell R, Garnero P, Kleerekoper M, Robins S, Srivastava A, Warnick R, Watts N, and Myers G. Assessment and recommendations on factors contributing to preanalytical variability of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline. *Clin Chem* 2002;48:220-235.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical investigation of osteoporosis. *Osteoporos Int Suppl* 1993;3:81-6.
- Colwell A, Russell RGG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest* 1993;23:341-9.
- Seibel MJ, Woitge H, Scheidt-Nave C, Leidig-Bruckner G, Duncan A, Nicol P, Ziegler R, Robins SP. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen in population-based screening for overt vertebral osteoporosis: results of a pilot study. *J Bone Miner Res* 1994;9:1433-40.
- Seibel MJ, Woitge HW. Basic principles and clinical applications of biochemical markers of bone metabolism: biochemical and technical aspects. *J Clin Densitom* 1999;2:299-321.
- Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, Delmas PD. Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner* 1990;8:87-96.
- McLaren AM, Hordon LD, Bird HA, Robis SP. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in patients with osteoporosis and the effects of bone fracture. *Ann Rheum Dis* 1992;51:648-51.
- Seibel MJ, Cosman F, Shen V, Gordon S, Dempster DW, Ratcliffe A, Lindsay R. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1993;8:881-9.
- Hashimoto K, Nozaki M, Yokoyama M, Sano M, Nakano H. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in oophorectomized women as markers for bone resorption. *Maturitas* 1994;18:135-42.
- Mazes RB and Barden HS. Bone density in premenopausal women: effects of age, dietary intake, physical activity, smoking, and birth-control pills. *Am J Clin Nutr* 1991;53:132-42.
- Méndez RO, Gómez MA, López AM, González H, Wyatt CJ. Effects of calcium and phosphorus intake and excretion on bone density in postmenopausal women in Hermosillo, México. *Ann Nutr Metab* 2002;46:249-253
- NCSS 60: NCSS 6.0.21-2 Statistical System for Windows, Kaysville, Utah. Number Cruncher Statistical Systems, 1996.
- Eastell R, Colwell A, Hampton L, Reeve J. Biochemical markers of bone resorption compared with estimates of bone resorption from radiotracer kinetic studies in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1997;12:59-65.
- Yu SL, Ho, LM, Lim BC, Sim ML. Urinary deoxypyridinoline is a useful biochemical bone marker for the management of postmenopausal osteoporosis. *Ann Acad Med Singapore* 1998;27:527-9.
- Pfister, A.K., Martin, S., Welch Ch., and Saville, P.D. A single determination of a urinary biochemical marker of bone turnover for detecting bone density in the hip. *J App Res* 2002;2(3).
- Aparici M, Navarro M, Rabanaque G, García A, Otte A, Soriano M, Viñals E. Se encuentra en : <http://www.enfervalencia.org/ei/articles/rev55/artic05.htm>.
- Griesmacher A, Peichl P, Pointinger P, Mateau R, Broll H 2nd, Hartl W, Gruber W. Biochemical markers in menopausal women. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1997;227:64-72.
- Peichl P, Griesmacher A, Pointinger P, Marteau R, Hartl W, Gruber W, Broll, H. Association between female sex hormones and biochemical markers of bone turnover in peri- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1998;62:388-394.
- Raisz LG, Wiita B, Artis A, Bowen A, Schwartz S, Trahiotis M, Shoukri K, Smith J. Comparison of the effects of estrogen

- alone and estrogen plus androgen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:37-43.
21. Gorai I, Taguchi Y, Chaki O, Kikuchi R, Nakayama M, Yang BC, Yokota S, and Minaguchi H. Serum soluble interleukin-6 receptor and biochemical markers of bone metabolism show significant variations during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:326-332.
 22. Zittermann A, Schwarz I, Scheld K, Sudhop T, Berthold H, von Bergmann K, H. van der Ven and Stehle P. Physiologic fluctuations of serum estradiol levels influence biochemical markers of bone resorption in young Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 95-101.
 23. Marks SJ, Batra RR, Frishman WH. Estrogen replacement therapy for cognitive benefits: viable treatment or forgettable "senior moment"? *Heart Dis.* 2002 Jan-Feb;4(1):26-32.
 24. Godsland IF. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974-2000. *Fertil Steril.* 2001 May;75(5):898-915.
 25. van der Mooren MJ, Kenemans P. Postmenopausal hormone therapy: impact on menopause-related symptoms, chronic disease and quality of life. *Drugs.* 2004;64(8):821-36.
 26. Kerlikowske K, Miglioretti DL, Ballard-Barbash R, Weaver DL, Buist DS, Barlow WE, Cutter G, Geller BM, Yankaskas B, Taplin SH, Carney PA. Prognostic characteristics of breast cancer among postmenopausal hormone users in a screened population. *J Clin Oncol.* 2003 Dec 1;21(23):4314-21.
 27. Hoibraaten E, Qvigstad E, Arnesen H, Larsen S, Wickstrom E, Sandset PM. Increased risk of recurrent venous thromboembolism during hormone replacement therapy-results of the randomized, double-blind, placebo-controlled estrogen in venous thromboembolism trial (EVTET). *Thromb Haemost.* 2000 Dec;84(6):961-7.
 28. Warren MP. A comparative review of the risks and benefits of hormone replacement therapy regimens. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Apr;190(4):1141-67.
 29. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:337-49.
 30. Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL J. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *Bone Miner Res* 1990;5:311-9.
 31. Iki M, Kajita E, Dohi Y, Nishino H, Kusaka Y, Tsuchida C, Yamamoto K, Ishii Y. Age, menopause, bone turnover markers and lumbar bone loss in healthy Japanese women. *Maturitas* 1996;25:59-67.
 32. Taguchi Y, Gorai I, Zhang MG, Chaki O, Nakayama M, Minaguchi H. Differences in bone resorption after menopause in Japanese women with normal or low bone mineral density: quantitation of urinary cross-linked N-telopeptides. *Calcif Tissue Int* 1998;62:395-9.
 33. Mazzuoli G, Acca M, Pisani D, Diacinti D, Scarda A, Scarnecchia L, Pacitti MT, D'Erasmus E, Minisola S, Bianchi G, Manfredi G. Annual skeletal balance and metabolic bone marker changes in healthy early postmenopausal women: results of a prospective study. *Bone* 2000;26:381-6.
 34. Kärkkäinen M, Lamberg-Allardt Ch, Ahonen S, and Välimäki M. Does it make a difference how and when you take your calcium? The acute effects of calcium on calcium and bone metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001;74: 335-342.
 35. Karkkainen M, Lamberg-Allardt C. An acute intake of phosphate increases parathyroid hormone secretion and inhibits bone formation in young women. *J Bone Miner Res* 1996;11:1905-1912.
 36. Grimm M, Muller A, Hein G, Funfstuck R, Jahreis G. High phosphorus intake only slightly affects serum minerals, urinary pyridinium crosslinks and renal function in young women. *Eur J of Clin Nut* 2001;55:153-161.
 37. Whybro A, Jagger H, Barker M, Eastell R. Phosphate supplementation in young men: lack of effect on calcium homeostasis and bone turnover. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:29-33.

Recibido: 26-05-2004

Aceptado: 20-10-2004

Efecto de la suplementación oral con cobre en el perfil lipídico de pacientes venezolanos hiperlipémicos

Alarcón-Corredor OM, Guerrero Y, Ramírez de Fernández M, D'Jesús I, Burguera M, Burguera JL, Di Bernardo ML, García MY y Alarcón AO

IVAIQUIM (Instituto Venezolano-Andino para Investigaciones Químicas), Facultad de Ciencias, Escuela de Nutrición y Dietética. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

RESUMEN. Se considera que la mayoría de las dietas occidentales satisfacen los requerimientos diarios de cobre debido a su presencia ubicua en los alimentos. Estudios recientes han demostrado que el cobre alimentario se encuentra a menudo por debajo de sus requerimientos diarios, lo que puede determinar una carencia de este elemento. Esta carencia está asociada con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, tanto en humanos como en animales experimentales. En el presente estudio de intervención se examinó el efecto de la administración de 5 mg de Cu/día, en 73 pacientes (grupo tratado), de ambos géneros, con edades entre 26 y 48 años, con niveles séricos elevados de colesterol total y de triglicéridos sin tratamiento con drogas hipolipémicas y se comparó con 73 pacientes hiperlipémicos no sometidos a tratamiento con Cu (grupo control), quienes fueron agrupados por género, edad, peso corporal, consumo de cigarrillos, ingesta de calorías y grasas y actividad física. Antes de administrar el cobre, se extrajo una muestra de sangre para las determinaciones de cobre, cinc y lípidos séricos. Al final del periodo experimental (45 días), se obtuvo una nueva muestra de sangre para las determinaciones correspondientes. Los resultados sugieren la existencia de una carencia marginal del elemento traza en el 38% de los sujetos y demuestran que el cobre disminuye significativamente ($p < 0.05$) los niveles séricos de colesterol total ($r = -0.976$), de triglicéridos ($r = -0.972$), de LDL-colesterol ($r = -0.961$) y de cinc ($r = -0.980$) con un ligero incremento ($r = 0.894$) del HDL-colesterol. Estos hallazgos demuestran que el cobre se puede emplear en el tratamiento de los pacientes con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia; aunque los mecanismos, que explican como el cobre determina estos cambios, no se conocen exactamente.

Palabras clave: Perfil lipídico, colesterol, triglicéridos, suplemento de cobre, hiperlipidemia, cinc sérico.

INTRODUCCION

El cobre (Cu) es un elemento traza esencial necesario para el desarrollo y el mantenimiento de la integridad cardiovascular y ósea, la estructura y función del sistema nervioso central, (incluyendo el desarrollo y la función del cerebro), la función eritropoyética, el crecimiento corporal, los mecanismos de defensa del huésped, la maduración de las células sanguíneas blancas y rojas, el transporte del hierro, el metabolismo del colesterol y de la glucosa y la contractilidad

SUMMARY. Effect of copper supplementation on lipid profile of Venezuelan hyperlipemic patients. It has been assumed that most Western diets satisfy the requirement of copper/day because of ubiquitous presence of this element in most foods. Recent studies have shown that dietary copper (Cu) may often fall below the estimated daily requirements, what could determine a deficiency of this trace element. This deficiency is associated with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia, both in human and experimental animals. In the present intervention study was examined the effect of the administration of 5 mg of Cu/day in 73 patients (treated group), of both genders, with ages between 26 and 48 years, with high serum levels of total cholesterol and triglycerides without pharmacological treatment and compared with 73 hyperlipemic subjects non-treated with copper (control group) who were matched by gender, age, body weight, smoking habits, calories and fat intake, and physical activity. Before copper administration, a sample of blood was obtained for serum determinations of copper, zinc and lipids. At the end of the experimental period (45 days), a new sample of blood was taken for the corresponding determinations. The results suggest the existence of a marginal deficiency of the trace element in 38% of the subjects and demonstrate that copper supplementation decreases ($p < 0.05$) serum levels of total cholesterol ($r = -0.976$), triglycerides ($r = -0.972$), LDL-cholesterol ($r = -0.961$) and zinc ($r = -0.980$) with a slight increment ($r = 0.894$) of HDL-cholesterol. These findings demonstrate that copper can be used in the treatment of the patients with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. The mechanisms by which Cu determines these changes are not known.

Key words: Lipid profile, cholesterol, triglycerides, copper supplement, hyperlipidemia, serum zinc.

miocárdica (1). Las manifestaciones clínicas más constantes de su carencia son anemia, neutropenia y lesiones óseas (2). Otras manifestaciones incluyen hipopigmentación del cabello, hipotonía, trastornos del crecimiento, incidencia elevada de infecciones y alteraciones de la capacidad fagocitaria de los neutrófilos (3). En el hombre y en los animales experimentales, la carencia del metal también determina trastornos del metabolismo de los lípidos con hiperlipemia que se acompaña de modificaciones en el perfil lipoproteico (4). En sujetos alimentados con una dieta experimental baja en cobre se

observa un incremento en la concentración sérica del colesterol total y del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) y una concentración reducida del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol) (5). Sin embargo, otros experimentos no han reproducido estos cambios en el metabolismo del colesterol (6).

Experiencias realizadas en ratas muestran que el suplemento de cobre por vía oral disminuye ($p < 0.05$) el nivel sérico de colesterol y de triacilglicérols (triglicéridos) y el contenido hepático de cinc (Zn) (7). En pollos, la administración de dosis farmacológicas de Cu en la dieta (250 mg Cu/kg) disminuye las concentraciones plasmáticas y musculares de colesterol (8) y en novillos, Engle et al. (9) informaron que la suplementación con 20 a 40 mg de Cu/kg de dieta, disminuye significativamente ($p < 0.05$) la colesterolemia. Por su parte, Singh et al. (10) en personas con hiperlipidemia encontraron que la ingesta diaria de 0.5 a 1 kg./día de guayaba, que contiene altas cantidades de Cu (5.2 mg) se asocia con una disminución significativa en el colesterol sérico y en los triglicéridos. Es interesante señalar que las observaciones previas de Jones et al. (11) y de Medeiros et al. (12) concluyen que los efectos de la suplementación con Cu sobre el metabolismo lipídico requieren de una investigación más intensa.

A pesar de la extensa literatura que existe en relación al tema, son muy pocos los trabajos publicados respecto al efecto del cobre por vía oral sobre los niveles de lípidos sanguíneos en pacientes con hiperlipidemia. Por esta razón, el motivo de la presente investigación fue examinar el efecto de la suplementación con cobre sobre los niveles séricos del colesterol total, triglicéridos (triacilglicérols), HDL-colesterol y LDL-colesterol de pacientes, de ambos géneros, con hiperlipemia. Simultáneamente se determinó la concentración sérica de Cu y de Zn, al inicio y al final del periodo experimental. El estudio pretende demostrar que una dieta suplementada con cobre disminuye los niveles de lípidos séricos en pacientes con hiperlipidemia, con mayor efectividad que una dieta balanceada adecuada. Esto pudiera ser de menor costo para una terapia efectiva contra la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Selección de los sujetos

El presente estudio de intervención se realizó en la Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina (Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela) conjuntamente con el Ambulatorio Belén de la Ciudad de Mérida (Venezuela). Se seleccionaron al azar 200 pacientes, de ambos géneros, con edades comprendidas entre 26-48 años, que acudieron a la Consulta Externa del Ambulatorio Belén debido a una hiperlipidemia moderada, de los cuales 146 se incorporaron

al estudio, de acuerdo con nuestros criterios de inclusión. De cada uno de los participantes se obtuvo, mediante cuestionario, información sobre edad, género, existencia de enfermedades agudas o crónicas, consumo de cigarrillos y de alcohol, actividad física, hábitos alimentarios e historia familiar de cardiopatías. Todos los sujetos eran clínicamente sanos y, por lo general, tenían un estilo de vida sedentario y se encontraban en el mismo nivel socio-económico bajo. De acuerdo con los criterios de inclusión establecidos, sólo personas con LDL-colesterol mayor de 100 mg/dL; triglicéridos por debajo de 400 mg/dL y colesterol total por arriba de 200 mg/dL se incluyeron. Los criterios de exclusión fueron hiperlipemia secundaria, diabetes no controlada, embarazo, lactancia, índice de masa corporal $> 35 \text{ kg/m}^2$, enfermedades cardiovasculares severas, urea sanguínea mayor de 40 mg/dL, presencia de procesos inflamatorios e infecciosos agudos o crónicos, antecedentes de enfermedades gastrointestinales y hepáticas o la no aceptación voluntaria por escrito para la participación en el estudio ($n = 54$).

Plan de estudio

A todas las personas seleccionadas se les explicó al procedimiento experimental a seguir y se les pidió su consentimiento voluntario por escrito para su participación en la investigación, de acuerdo con las normas internacionales. Después de firmar el consentimiento y tras un período libre de drogas hipolipemiantes de 2 semanas, a cada uno de los sujetos se les extrajo una muestra de sangre para la determinación de Cu, cinc (Zn) y lípidos séricos. A las 24 horas de obtenida esta muestra, los pacientes se dividieron al azar en dos grupos con características similares. A un grupo (hombres = 40 y mujeres = 33) se le suministró diariamente, por vía oral, una cápsula que contiene 5 mg de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, p.a. Merck) y almidón c.s.p. 20 mg (grupo tratado), cantidad similar a la suministrada por Singh et al. (10) y al otro grupo (hombres = 38 y mujeres = 35) se le suministró una cápsula placebo/día, que contiene almidón, c.s.p. 20 mg (grupo control o placebo) durante un período de 45 días. Al finalizar el período, se recolectó una nueva muestra de sangre para la determinación de Cu, Zn y lípidos séricos.

Recolección de los datos

Se realizaron visitas semanales a todos los pacientes, hasta finalizar el período experimental; en estas visitas uno de los integrantes del equipo se encargó de suministrar a cada uno de los sujetos la cantidad de cápsulas (cobre o placebo) para el tratamiento semanal y se aseguró de que todos ellos lo cumplieran. Al mismo tiempo recolecto la información sobre cuantos sujetos abandonaron o no se apegaron al tratamiento y la aparición de efectos colaterales con el cobre suministrado.

Recolección de las muestras

Dos muestras de sangre (10 mL) se extrajeron de las venas del antebrazo, mediante agujas de acero inoxidable y jeringas plásticas, entre 7:00-9:00 am, tras un periodo de ayuno de 12 horas: la primera, 24 horas antes del inicio de la administración del Cu o del placebo, y la otra a los 45 días al finalizar el período experimental. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de ensayo de vidrio, se les dejó coagular espontáneamente y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm para asegurar la rápida obtención de los sueros, que se mantuvieron refrigerados a 4°C y se analizaron antes de las 24 horas.

La determinación de Cu y del Zn en el suero sanguíneo se realizó por espectroscopia de absorción atómica, empleando un espectrofotómetro marca Varían modelo 1475, equipado con un nebulizador de impacto, lámparas de cátodo hueco marca Varían para Cu y Zn y un mechero con ranura 10 cm. para la llama de aire/acetileno. Los niveles de Cu, Zn y lípidos séricos en los pacientes hiperlipidémicos se compararon con los de 80 pacientes sanos (42 hombres y 38 mujeres) dentro del mismo rango de edad, que acudieron a las instalaciones de la Cruz Roja en la ciudad de Mérida (Venezuela). Los valores de Cu sérico <0.70 µg/mL y de cinc <0.70 µg/mL se escogieron como puntos de corte para indicar una nutrición inadecuada (carencia marginal) de estos elementos traza, de acuerdo con los valores reportados en la literatura (13, 14).

El colesterol sérico total se determinó por el procedimiento enzimático descrito por Allain et al. (15) y los triglicéridos (triacilglicéridos) por el método enzimático descrito por Bucolo y David (16) utilizando los kits comerciales de los Laboratorios Qualitest (Caracas, Venezuela). El HDL-colesterol se determinó utilizando un reactivo precipitante disponible comercialmente (colesterol HDL, No. 543004. Reactivo precipitante Boehringer Mannheim), basado en las propiedades precipitantes del ácido fosfotúngstico (0.44 mol/L), descrito por Burnstein et al. (17). Este método de precipitación asegura una rápida y completa separación del HDL-colesterol de otras lipoproteínas. El nivel de LDL-colesterol se estimó utilizando la fórmula desarrollada por Friedewald et al. (18), que suministra resultados confiables si el contenido de triglicéridos es inferior a 400 mg/dL. Para el control de calidad se utilizó el Precinorm^RL, de los Laboratorios Boehringer Mannheim. El consumo de calorías y de grasas totales se calculó mediante el método del recordatorio de 48 h, al inicio y al final del período experimental.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como medias±DE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de regresión lineal simple y ANOVA de una vía y test de Tukey post-ANOVA. Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico Statgrafic 5.0 Plus. El nivel de significación estadística se determinó a p<0.05.

RESULTADOS

La dosis de Cu suministrada a los pacientes (5 mg de Cu/día) se encuentra por debajo del nivel del ingreso tolerable más alto (UL), que se define como "el nivel más elevado del ingreso diario de un nutriente que probablemente no determine efectos dañinos en la mayor parte de los individuos de la población en general". Este valor corresponde a 10 mg de Cu/día (14). Los ingresos que exceden el UL incrementan el riesgo de efectos dañinos en el individuo. No obstante, en 5 pacientes (2 hombres y 3 mujeres), se presentaron alteraciones agudas del tracto gastrointestinal (náuseas, vómitos, dolor abdominal) por cuyo motivo se excluyeron mientras que otros dos (un hombre y una mujer) abandonaron voluntariamente el estudio (n= 7).

El consumo de calorías, grasas neutras y colesterol de los pacientes hiperlipémicos (grupos tratado y control) se muestra en la Tabla 1. El análisis estadístico no demostró diferencias significativas al comparar estos grupos al inicio y al final del período experimental.

TABLA 1
Consumo de energía, grasas neutras y colesterol de los pacientes hiperlipémicos

Variables	Hiperlipémicos (139)			
	Grupo tratado		Grupo control (73)	
	0 (73)	45 (66)	0	45
Energía Kcal/d	1900±163	1951±166	1890±135	1915±147
Grasas neutras g/d	50±8	51±7	49±6	50±8
Colesterol g/d	120±15	122±12	122±18	121±20

Los resultados se expresan en promedios±DE.

() Número de personas en cada grupo.

Niveles séricos de cobre y de cinc

Las modificaciones de los valores séricos de cobre (cupremia) y de cinc (cincemia) se muestran en la Tabla 2. Se observa una disminución significativa (p<0.05) de la cupremia al comparar el grupo sano con los pacientes hiperlipémicos. A los 45 días de suplementación con cobre, la cupremia no difiere significativamente al comparar el grupo sano con el tratado (1.20±0.19 vs 1.18±0.23 µg/mL, respectivamente). De acuerdo con el punto de corte del Cu sérico <0.70 µg/mL cerca del 38% de los sujetos en el grupo tratado, al inicio del estudio, presenta un riesgo incrementado de padecer una carencia marginal de cobre, que desaparece a los 45 días de administrado el elemento traza. En la misma tabla se observa que la suplementación con Cu disminuyó significativamente

($p < 0.05$) la cincemia (1.10 ± 0.27 vs 0.87 ± 0.25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) a los 45 días, incrementando el riesgo de una carencia de Zn en el 40% de los sujetos.

TABLA 2
Niveles séricos de cobre y de cinc en el grupo sano y en los pacientes hiperlipémicos

Elemento	Grupo sano (80)	Hiperlipémicos (139)			
		Grupo tratado		Grupo control (73)	
		0 (73)	45 (66)	0	45
Cobre	1.20 ± 0.19 (0.65-1.65)	0.91 ± 0.12^a (0.65-1.16)	1.18 ± 0.23^b (0.97-1.33)	0.99 ± 0.10^a (0.68-1.15)	0.91 ± 0.11^a (0.67-1.14)
Cinc	1.00 ± 0.18 (0.67-1.28)	1.10 ± 0.27 (0.98-1.22)	0.87 ± 0.25^b (0.65-1.08)	1.10 ± 0.12^b (0.97-1.24)	1.12 ± 0.08^b (0.98-1.25)

Los resultados se expresan en $\mu\text{g/mL}$ (promedios \pm DE).

^a $p < 0.05$ estadísticamente significativo al comparar con el grupo sano.

^b $p < 0.05$ estadísticamente significativo al comparar 0 días con 45 días.

La Tabla 3 muestra las variaciones en los lípidos séricos con la administración de cobre. El análisis de la misma indica que, con excepción del HDL-colesterol, todos los lípidos valorados disminuyen significativamente ($p < 0.05$) con el suplemento de cobre.

TABLA 3
Niveles séricos de lípidos en el grupo sano y en los pacientes hiperlipémicos

Fracción	Grupo sano (80)	Hiperlipémicos (139)			
		Grupo tratado		Grupo control (73)	
		0 (73)	45 (66)	0	45
Colesterol	132 ± 24	275 ± 43^a	206 ± 21^a	268 ± 33^a	270 ± 28^a
Triglicéridos	145 ± 16	163 ± 45^a	107 ± 33^{ab}	168 ± 28^a	170 ± 29^a
HDL-colesterol	35 ± 3	36 ± 2	40 ± 1^{ab}	37 ± 3^a	39 ± 2^a
LDL-colesterol	141 ± 21	207 ± 46^a	147 ± 22^b	209 ± 43^a	211 ± 41^a

Los resultados se expresan en mg/dL (promedios \pm DE).

^a $p < 0.05$ estadísticamente significativo al comparar con el grupo sano

^b $p < 0.05$ al comparar 0 días con 45 días.

() Número de personas en cada grupo.

En el grupo tratado se encontró una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre cobre y colesterol total ($r = -0.877$; $R^2 = 76.90\%$), cobre y triglicéridos ($r = -0.886$; $R^2 = 78.45\%$), cobre y HDL-colesterol ($r = 0.767$; $R^2 = 54.84\%$), cobre y LDL-colesterol ($r = -0.865$; $R^2 = 74.79\%$), colesterol total y cinc ($r = 0.978$; $R^2 = 97.56\%$), triglicéridos y cinc ($r = 0.993$; $R^2 = 98.68\%$), HDL-colesterol y cinc ($r = -0.947$; $R^2 = 89.61\%$), LDL-colesterol y cinc ($r = 0.986$; $R^2 = 97.29\%$), colesterol total y triglicéridos ($r = 0.988$; $R^2 = 99.70\%$),

colesterol total y HDL-colesterol ($r = -0.954$; $R^2 = 90.93\%$), colesterol total y LDL-colesterol ($r = 0.999$; $R^2 = 99.87\%$), triglicéridos y HDL-colesterol ($r = -0.962$; $R^2 = 92.63\%$), triglicéridos y LDL-colesterol ($r = 0.999$; $R^2 = 99.75\%$) y entre HDL-colesterol y LDL-colesterol ($r = -0.964$; $R^2 = 92.86\%$).

DISCUSION

De los resultados obtenidos se puede deducir que los valores séricos promedio de Cu de los pacientes hiperlipémicos son significativamente ($p < 0.05$) menores al comparar con adultos sanos, de ambos géneros, residentes en la ciudad de Mérida. El valor de cobre sérico < 0.70 $\mu\text{g/mL}$ (14) sugiere un riesgo incrementado de carencia marginal de cobre en el 38% de los pacientes.

Aunque, generalmente se considera que la deficiencia de cobre no es un problema en los humanos porque el metal se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos que sirven como base para la mayoría de las dietas en todo el mundo, en la actualidad se conoce que la deficiencia de cobre en los seres humanos ocurre (19), aunque la magnitud del problema, así como su naturaleza y su frecuencia en la población en general, deberán ser establecidas. Por consiguiente, en estos pacientes es necesario documentar de una manera más adecuada esta condición clínica mediante la determinación de la actividad sérica y tisular de diversas cuproenzimas.

Una anomalía que se observa en humanos y en animales de experimentación en la carencia de Cu es un incremento en la síntesis hepática de triglicéridos y de colesterol que se acompaña de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (4,5) que concuerda con lo que se encuentra en nuestros pacientes.

A diferencia de nuestros hallazgos, Milne y Nielsen (20) en mujeres postmenopáusicas sometidas a una dieta que contenía 0.57 mg de Cu/día (dieta deficiente en cobre), durante 105 días, concluyeron que los ingresos bajos en este micronutriente no inducen los cambios en el colesterol sérico que generalmente se encuentran en los modelos animales deficientes en cobre.

El hallazgo más característico de la presente investigación es la disminución significativa de los niveles séricos del colesterol total, triglicéridos, LDL-colesterol y cinc con un ligero incremento del HDL-colesterol con la administración del cobre. Esta observación está de acuerdo, con los trabajos de Singh et al. (10) quienes, en sujetos hiperlipidémicos, encontraron que el consumo de 5.2 mg de cobre/día se asocia con una disminución significativa en el colesterol sérico (7.2%) y en los triglicéridos (9.1%), un incremento no significativo en el HDL-colesterol (4.6%) y un leve incremento en la relación colesterol total/HDL-colesterol en comparación con los niveles iniciales de cada uno de los pacientes.

Un argumento a favor de nuestros resultados es que en los pacientes con enfermedad de Wilson los niveles de colesterol

total y de LDL-colesterol son significativamente más bajos en comparación con el grupo control sano (21).

Nuestros resultados están en desacuerdo con las observaciones previas de Jones et al. (11) y de Medeiros et al. (12) quienes en dos estudios doble ciego, de dos semanas de duración, evaluaron los efectos de los suplementos de 2 ó 3 mg Cu/día sobre el colesterol sérico total y las fracciones colesterol-lipoproteínas en hombres adultos y concluyeron que los efectos de la suplementación con Cu requieren de una investigación ulterior. Es posible que las dosis y/o el tiempo de administración del cobre no fueran adecuados para disminuir los niveles de los lípidos sanguíneos. Recientemente, Abiaka et al. (22) en sus experiencias concluyen, que a diferencia de los estudios en animales, el cobre en exceso está asociado con hiperlipemia y, por lo tanto, puede predisponer a la aterosclerosis.

La suplementación con cobre también disminuye ($p < 0.05$) la concentración sérica de cinc. Las interacciones y el antagonismo entre estos metales han sido reconocidas en los animales y en el hombre. La competencia por los sitios de unión/depósito con las metalotioneínas parece proporcionar la mejor explicación para el proceso. En consecuencia, en condiciones de sobrecarga de cobre, el cinc puede ser fácilmente desplazado de sus sitios de depósito y/o absorción, con disminución de su concentración sérica y producción de una carencia del mismo (23).

La presencia de la carencia de cinc es posible que produzca la alteración de los lípidos séricos. Burch et al. (24) informaron que la carencia de cinc produce hipocolesterolemia en cerdos, ratas y humanos. Una declinación lineal en el colesterol plasmático se encontró en dos hombres durante un periodo de privación de cinc (25). En un estudio previo, Koo et al. (26) en ratas macho adultas, demostraron que la hipocolesterolemia determinada por la carencia de cinc se debe a una disminución selectiva en el HDL-colesterol. Sin embargo, Khoja et al. (27) en ratas tratadas con una dieta severamente deficiente en cinc encontraron concentraciones séricas de colesterol total y de HDL-colesterol significativamente incrementadas ($p < 0.01$) y de triglicéridos disminuidas ($p < 0.01$) mientras que en ratas con carencias marginales del elemento no se observan estas alteraciones al comparar con las ratas control. En hombres adultos sanos, la administración oral de 440 mg de sulfato de cinc/día por 5 semanas disminuye, en un 25%, la concentración del HDL-colesterol sin cambios en el colesterol total, los triglicéridos y el LDL-colesterol (28) y en pacientes adultos sometidos a hemodiálisis, los suplementos de cinc incrementan el colesterol total y el LDL-colesterol en sangre (29).

En relación con las correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre el cobre, el cinc y las diferentes fracciones lipídicas de la presente investigación, Neggers et al. (30) no encontraron asociaciones significativas entre el cinc y el cobre en el suero

y los valores de colesterol total, triglicéridos, HDL-colesterol y LDL-colesterol al evaluar el estado de estos elementos traza y los niveles séricos de los lípidos de los adultos de una comunidad africana-americana. Tiber et al. (31) tampoco pudieron observar la asociación entre el cinc y el cobre plasmático y los niveles séricos de lípidos y de lipoproteínas en pacientes con aterosclerosis coronaria comprobada, aunque el colesterol total estaba significativamente correlacionado con el LDL-colesterol y con los triglicéridos e inversamente correlacionado con la relación HDL-colesterol/colesterol total.

CONCLUSIONES

La administración de cobre (5 mg/d) a los pacientes hiperlipémicos reduce significativamente los valores de los lípidos sanguíneos. Este hallazgo indica una alteración funcional en la regulación del metabolismo lipídico durante la carencia moderada de cobre y sugiere que el Cu se puede emplear en el tratamiento de la hiperlipidemia moderada. La existencia de datos contradictorios requiere de investigaciones futuras para esclarecer la extensión de esta influencia. Nuestro equipo de investigación está llevando a cabo estudios extensos en humanos y animales experimentales, que están ahora en sus fases finales, para obtener una información más concluyente acerca de los efectos de los suplementos de cobre sobre la síntesis y/o la degradación de las diversas fracciones lipoproteicas.

REFERENCIAS

1. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 797S-811S.
2. Danks DM. Copper deficiency in humans. *Annu. Rev. Nutr* 1988; 8: 235-257.
3. Shaw JCL. Copper deficiency in term and preterm infants. In: Fomon SJ, Zlotkin S. eds. *Nutritional anemias*. Nestlé Nutrition Workshop Series. Vol 30, New York: Raven Press. 1992. pp. 105-119.
4. Allen KGD, Klevay LM. Copper: an antioxidant nutrient for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 22-28.
5. Klevay LM, Inman L, Johnson LK, Lawler M, Mahalko JR, Milne DB, Lukaski HC, Bolonchuk W, Sandstead HH. Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion. *Metabolism* 1984; 33: 1112-1118.
6. Kelley DS, Daudu PA, Taylor PC, Mackey BE, Turlund JR. Effects of low-copper diets on human immune response. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 412-416.
7. Alarcón-Corredor OM, Carnevalí de Tatá E, Reinoso-Füller J, Contreras Y, Ramírez de Fernández M, Yáñez-Domínguez C. Modificaciones de los lípidos séricos de ratas suplementadas con cobre por vía oral. *Arch Latinoam Nutr*. 2000; 50: 249-256.

8. Pesti MG, Bekalli RI. Studies on the feeding of cupric sulphate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. *Poult Sci* 1996; 75:1086-1091.
9. Engle TE, Spears JW. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *J Anim Sci* 2000; 78: 2452-2458.
10. Singh RB, Sharma VK, Singh R, Rastogi SS. Does increased consumption of dietary copper decrease blood lipids?. *Trace Elem Med* 1992; 9: 28-33.
11. Jones AA, DiSilvestro RA, Coleman M, Wagner T. Copper supplementation of adult men: effects on blood copper enzyme activities and indicators of cardiovascular disease risk. *Metabolism* 1997; 46 :1380-1383.
12. Medeiros DM, Milton A, Brunett E, Stacy L. Copper supplementation effects on indicators of copper status and serum cholesterol in adult males. *Biol Trace Elem Res* 1991; 30: 19-35.
13. Gibson R, Smit-Vanderkooy P, McDonald A, Goldman A, Ryan R, Berry M. A growth-limiting, mild zinc-deficiency, syndrome in some Southern Ontario boys with low height percentiles. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 1266-1273.
14. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academy Press. Washington, D.C. 2001. pp. S5-S7.
15. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974 20: 470-475.
16. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476-482.
17. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res.* 1970; 11: 583-595.
18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.
19. Klevay LM. Cardiovascular disease from copper deficiency: a history. *J Nutr* 2000; 130 (2S Suppl): 489S-492S.
20. Milne DB, Nielsen FH. Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 358-364.
21. Rodo M, Czonkowska A, Pulawska M, Swiderska M, Tarnacka B, Wehr H. The level of serum lipids, vitamin E and low density lipoprotein oxidation in Wilson's disease patients. *Eur J Neurol* 2000; 1: 7: 491-494.
22. Abiaka C, Olusi S, Al-Awadhi A. Serum microminerals and the indices of lipid metabolism in an apparently healthy population. *J Clin Lab Anal.* 2003; 17: 61-65.
23. Mills CF. Dietary interactions involving the trace elements. *Annu Rev Nutr* 1985; 5: 173-193.
24. Burch RE, Williams RV, Hahn HKJ, Jetton MM, Sullivan JF. Serum and tissue enzyme activity and trace-element content in response to zinc deficiency in the pig. *Clin Chem* 1975; 21: 568- 577.
25. Sandstead H, Klevay L, Mahalko J, Inman W, Bolonchur H, Lukaski G, Lykken T, Kramer L, Johnson D, Wallwork J. Marginal Zn nutriture: effects on lipid metabolism and plasma zinc. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 994 (abstr).
26. Koo SI, Williams DA. Relationship between the nutritional status of zinc and cholesterol concentration of serum lipoproteins in adult male rats. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 2376-2381.
27. Khoja SM, Marzouki ZM, Ashry KM, Hamdi SA. Effect of dietary zinc deficiency on rat lipid concentrations. *Saudi Med J.* 2002; 23: 82-86.
28. Hooper PL, Visconti L, Garry PJ, Johnson GE. Zinc lowers high-density lipoprotein-cholesterol levels. *JAMA* 1980; 244: 1960-1961.
29. Chevalier CA, Liepa G, Murphy MD, Suneson J, Vanbeber AD, Gorman MA, Cochran C. The effects of zinc supplementation on serum zinc and cholesterol concentrations in hemodialysis patients. *J Ren Nutr.* 2002; 12: 183-189.
30. Neggers YH, Bindon JR, Dressler WW. The relationship between zinc and copper status and lipid levels in African-Americans. *Biol Trace Elem Res.* 2001; 79: 1-13.
31. Tiber AM, Sakhaii M, Joffe CD, Ratnaparkhi MV. Relative value of plasma copper, zinc, lipids and lipoproteins as markers for coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 1986; 62: 105-110.

Recibido: 11-06-2004

Aceptado: 14-12-2004

Níveis plasmáticos de vitamina A e os resultados obstétricos e perinatais em gestantes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Patrícia El Beitune, Geraldo Duarte, Hélio Vannucchi, Silvana Maria Quintana, Ernesto Antonio Figueiró-Filho, Edson Nunes de Moraes, Antonio Alberto Nogueira

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HC-FMRPUSP)

RESUMO. Avaliar os níveis plasmáticos de vitamina A e a sua associação com os resultados obstétricos e perinatais em gestantes portadoras do HIV. Estudo observacional e prospectivo realizado no Setor de Doenças Infecto-Contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, envolvendo 57 gestantes divididas em 3 grupos: Grupo 1, com 12 gestantes normais, foi o grupo controle; Grupo 2, com 20 gestantes portadoras do HIV, utilizando AZT; e Grupo 3, com 25 gestantes portadoras do HIV, usando terapia combinada contendo AZT, 3TC e nelfinavir. A avaliação do nível plasmático de vitamina A foi realizada em três períodos equidistantes durante a gestação e no puerpério imediato. Avaliou-se também os níveis dessa vitamina e da hemoglobina no sangue do cordão umbilical. Foram aferidos dados antropométricos maternos, neonatais, assim como a contagem de linfócitos TCD₄ e carga viral do HIV durante a gestação. Níveis plasmáticos reduzidos de vitamina A foi observada no grupo 1(25%), no grupo 2(29,4%) e no grupo 3(28,6%). Não se observou associação entre os níveis plasmáticos de retinol materno e a duração da gestação em gestantes do grupo 2 e 3. Nos grupos 1 e 3 observou-se associação entre a concentração materna do retinol e a hemoglobina do RN ($p=0,05$). De maneira distinta ao grupo controle, não se observou associação entre os níveis de retinol do cordão umbilical e o peso do recém-nascido em gestações do Grupo 2, enquanto uma tendência a essa associação foi observada em gestações do Grupo 3 ($p=0,06$). Verificou-se alta prevalência de hipovitaminose A na população deste estudo, independente do esquema anti-retroviral utilizado.

Palavras-chaves: Anti-retroviral, deficiência, HIV, gestação, vitamina A.

INTRODUÇÃO

A relação entre os fatores nutricionais e a resistência a infecções é sugerida há muito tempo, porém há apenas duas décadas tem sido realizados estudos sistematizados sobre esse tópico (1, 2). A avaliação da hipovitaminose A tem sido um importante objetivo dos serviços de saúde pública, acometendo significativa porcentagem das populações de países em desenvolvimento. Atualmente, existem 60 países onde a

SUMMARY. Serum vitamin A during pregnancy and effects on obstetrics and perinatal outcomes in HIV infected pregnant women. To evaluate serum vitamin levels and its association with obstetrics and perinatal results in HIV infected pregnant women. Observational and prospective study carried out at Division of Infectious-Contagious Diseases in Gynecology and Obstetrics of the University Hospital, Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, involving 57 pregnant women divided into 3 groups: Group 1, with 12 normal pregnant women, it was the control group; Group 2, with 20 HIV infected pregnant women, using ZDV; and Group 3, with 25 HIV infected pregnant women, using therapy I contend ZDV, 3TC and nelfinavir. The evaluation of the serum vitamin level was obtained three times during pregnancy at equidistant time intervals and in the immediate period after birth. We also evaluated the levels of this vitamin and the hemoglobin in the blood of the umbilical cord. We obtained maternal and newborn infant anthropometric data, as well as the counting of lymphocyte TCD₄ and viral load of the HIV during the pregnancy. Reduced serum vitamin levels were observed in the Group 1(25%), the Group 2(29,4%) and the Group 3(28,6%). Association was not observed between serum levels of maternal retinol and the duration of the gestation in groups 2 and 3. In groups 1 and 3, an association was observed between the maternal concentration of retinol and the newborn hemoglobin ($p=0,05$). In distinct way to the Control group, association was not observed between the retinol levels of the umbilical cord and the weight of the newborn in gestations of Group 2, while a trend to this association was observed in gestations of Group 3 ($p=0,06$). We observed high prevalence of hipovitaminosis A in the population of this study, regardless of antiretroviral scheme used.

Key words: Antiretroviral, deficiency, HIV, pregnancy, vitamin A.

hipovitaminose A é um importante problema de saúde pública, estando o Brasil incluído no referido grupo (3, 4).

Entre as inúmeras funções da vitamina A no organismo, destaca-se a sua proteção orgânica contra infecções, notadamente a redução das taxas de mortalidade materna relacionadas à gravidez (5, 6) e à infecção pelo HIV, ou vírus da imunodeficiência humana (7). Estudos conduzidos no início dos anos 60 na Índia identificaram a gestação como um período de vulnerabilidade para o desenvolvimento de

deficiência de vitamina A. No entanto, o impacto dessa deficiência para a saúde da mulher durante o ciclo gravídico-puerperal foi avaliado somente na década passada (8).

Durante a gestação se aceita que a hipovitaminose A apresente associação com imunodepressão, síndromes hipertensivas da gravidez, trabalho de parto pré-termo, baixo peso ao nascimento e com o aumento da suscetibilidade perinatal a infecções (7-11). No entanto, em pacientes portadoras da infecção pelo HIV, ainda se desconhece a real influência dos fatores nutricionais sobre o prognóstico da infecção. A possível intersecção entre hipovitaminose A e infecção pelo HIV tem sido verificada tanto no aumento de infecção sintomática pelo HIV em adultos quanto no incremento das taxas de transmissão vertical (7,12). Outros trabalhos, entretanto, não confirmam essas assertivas (13-15).

Há algum tempo tem-se a tendência de valorizar as deficiências nutricionais com a avaliação isolada dos níveis plasmáticos dos nutrientes. Os níveis sanguíneos classificados como convencionalmente baixos podem ser indicadores de risco de deficiência, entretanto a utilização exclusiva do indicador bioquímico como sinalizador de deficiência é freqüentemente insuficiente, visto que os indicadores classicamente empregados para detecção da hipovitaminose A são melhor avaliados no seu conjunto e incluem: os indicadores dietéticos, bioquímicos, fisiológicos, histológicos e clínicos atribuídos à determinada condição (16).

O presente estudo teve como objetivos avaliar prospectivamente um indicador bioquímico de deficiência de vitamina A, os níveis plasmáticos dessa vitamina, e a sua associação com os resultados obstétricos e perinatais durante a gestação de mulheres normais e portadoras do HIV. A presente casuística também objetivou avaliar a associação entre os níveis plasmáticos de vitamina A e dados imunológicos maternos e as repercussões do uso de anti-retrovirais sobre os níveis plasmáticos dessa vitamina e sobre a hemoglobina no sangue do cordão umbilical ao nascimento.

MATERIAL E METODOS

Amostra

Foi delineado estudo observacional, longitudinal e prospectivo (17), realizado no Setor de Moléstias Infecto-Contagiosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Brasil no período de setembro de 2001 a março de 2003. Selecionou-se inicialmente 65 gestantes, excluindo-se posteriormente oito gestantes por não cumprirem com os critérios metodológicos estipulados. Dessa forma, o estudo foi realizado com 57 gestantes entre 16 e 43 anos, com gestação de feto único, independente de raça ou paridade, não-portadora de insuficiência renal ou hepática. Dessas pacientes, 45 gestantes eram portadoras do HIV. As outras 12 gestantes

foram categorizadas como grupo controle (clínica e laboratorialmente normais) e foram selecionadas no Setor de Pré-Natal de Baixo Risco do HCFMRP-USP. Todas as pacientes forneceram o seu consentimento pós-informado para integrarem o estudo, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.

Havendo a detecção de indicadores de risco bioquímico de deficiência de vitamina A, a paciente foi assistida conjuntamente com profissionais da infectologia, obstetrícia e da nutrologia. A manutenção ou exclusão da paciente dos grupos de estudo dependeu de ampla discussão entre os profissionais das três áreas com o envolvimento da gestante, pesando-se os riscos-benefícios da manutenção da inclusão da gestante no estudo. Ficou estipulado, previamente à inclusão no estudo de que se houvesse a presença de sinais e sintomas de deficiência de vitamina A (18) e a necessidade de alguma intervenção (suplementação vitamínica), a paciente seria avaliada em um grupo à parte do grupo principal de pesquisa.

Selecionaram-se as pacientes portadoras do HIV (gestantes com exames imunoenzimáticos positivos contra o HIV em duas amostras séricas distintas, confirmados pelo Western-Blot) sem uso prévio de medicações anti-retrovirais nos 6 meses que antecederam a inclusão no estudo. O grupo controle foi designado grupo 1 e formado por 12 gestantes. As gestantes portadoras do HIV foram subdivididas em dois grupos designados: grupo 2 e grupo 3. O Grupo 2 foi composto de 20 gestantes portadoras do HIV e que preenchiam os requisitos para uso profilático do AZT ($CD_4 > 500$ células/ml e/ou $CV < 1.000$ cópias/ml). O Grupo 3 foi composto por 25 gestantes portadoras do HIV com indicação clínica e/ou laboratorial ($CD_4 < 500$ células/ml) para receberem terapia anti-retroviral tríplice (zidovudina + lamivudina + nelfinavir). Estes critérios são os critérios estabelecidos pelo Perinatal HIV Guidelines Working Group Members quanto ao uso de terapia anti-retroviral na gestante (19).

As dosagens orientadas para o grupo 2 foi zidovudina 300mg/dose em duas tomadas diárias. Para o grupo 3, que utilizou esquemas antiretrovirais combinados, utilizou-se zidovudina 300 mg, lamivudina 150mg e nelfinavir 1250 mg em duas tomadas diárias.

Experimentos

As amostras sanguíneas para dosagens plasmáticas de vitamina A foram obtidas em três oportunidades ao longo da gestação: entre a 12^a-20^a semanas; entre a 21^a-28^a semanas e entre a 29^a-36^a semanas de gestação. A última coleta foi realizada no puerpério imediato (nas primeiras 24 horas pós dequitação placentária). Adicionalmente, foi realizada coleta do sangue do cordão umbilical para essa avaliação e para a dosagem da hemoglobina do recém-nascido.

As amostras plasmáticas foram coletadas em ambiente com

luminosidade reduzida e foram obtidos 5 ml de sangue das gestantes selecionadas em tubos heparinizados recobertos para evitar-se a influência luminosa direta sobre o retinol. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, em rotor tamanho 18 perfazendo um RCF (força centrífuga relativa) de 1884g durante 10 minutos. O plasma obtido foi então acondicionado sob refrigeração a -70°C até o processamento das amostras. A análise foi realizada por espectrofotometria, com leitura em comprimento de onda de 620 nm, segundo técnica preconizada por Neeld & Pearson (20), dosado no Spektralphotometer PM6 da Zeiss West Germany.

Adicionalmente, durante o pré-natal foram aferidos os níveis da carga viral e da contagem dos linfócitos TCD₄. Essas variáveis foram obtidas em dois momentos durante a gestação, a 1ª coleta foi obtida entre 12-20 semanas e a 2ª coleta no período entre 32-38 semanas. Foram obtidos também os dados antropométricos maternos (massa corpórea e ganho de peso durante a gestação). Obteve-se, adicionalmente, dados do parto e do recém-nascido exemplificados pela idade gestacional, peso e índice de Apgar. O índice de Apgar avaliou 5 parâmetros, cada qual pontuado de 0 a 2 e detalhados em tônus muscular, pulso, irritabilidade reflexa, cor e respiração. Avaliou-se também a adequação antropométrica neonatal (21). Neste estudo, os valores de vitamina A abaixo de 20 $\mu\text{g/dl}$ foram considerados hipovitaminose (22).

Análise estatística

A variabilidade da vitamina A durante a gestação foi valorizada considerando-se a frequência encontrada, a mediana e a variação interquartil (respectivamente no 1º e 3º quartis). Foram utilizados os testes não paramétricos do qui-quadrado (X^2), Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis para comparações múltiplas, teste de Friedman para comparações múltiplas pareadas e o teste de correlação de Spearman. Considerou-se significativas as diferenças com $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa computacional SPSS 10.0.

RESULTADOS

Os valores das medianas da idade materna (anos) das pacientes do Grupo 1 foi 22,5 anos com variação interquartil (p25-p75) de 6 anos. No Grupo 2 foi de 24 anos (7 anos) e no Grupo 3 foi de 27 anos (6 anos), não sendo detectada diferença estatística entre estas variáveis (Teste de Kruskal-Wallis: 3,975, $p=0,137$). Quanto à raça (branca e não branca), observou-se que 83%, 50% e 68% das gestantes respectivamente do grupo 1, 2 e 3, apresentaram cor branca (teste do X^2 : 3,845, $p=0,146$). A avaliação dos dados referentes ao tabagismo também não revelou diferenças significativas, observando-se que 91%, 60% e 80% das gestantes do Grupo 1, 2 e 3 respectivamente não eram tabagistas (teste do X^2 : 4,559, $p=0,10$). As medianas do IMC inicial do Grupo 1, 2 e 3 foi respectivamente 21,9kg/m², 24,3kg/m² e 22,6kg/m² (Teste de Kruskal-Wallis: 4,060, $p=0,13$). A avaliação do IMC ao término da gestação final também delineou distribuição uniforme entre os grupos 1, 2 e 3 com medianas de 25,5 kg/m², 27,7kg/m² e 26,5kg/m², respectivamente (Teste de Kruskal-Wallis: 2,723, $p=0,25$). Apesar do maior ganho de peso entre as gestantes do Grupo 1, não se observou diferenças entre as pacientes dos três grupos (teste de Kruskal-Wallis: 4,510, $p=0,10$).

Os dados relativos ao número de linfócitos T-CD₄⁺ (células/mm³) e da carga viral do HIV-1 (cópias/ml) encontram-se na Tabela 1. Conforme esperado, a carga viral, inicialmente elevada (14.370 cópias/ml) reduziu significativamente no grupo 3, chegando a 40 cópias/ml (Wilcoxon, Z: -4,372, $p < 0,0001$). Os resultados mostram, diferenças significativas entre os grupos 2 e 3 (Mann-Whitney, Z: -4,953, $p < 0,0001$). Quanto à contagem de linfócitos T-CD₄⁺, observou-se recuperação significativa nas pacientes do Grupo 3, inicialmente com mediana de 399 células/mm³, chegando a 543 células/mm³ no final da gestação. Comparando os Grupos 2 e 3, verificou-se diferença significativa destes números entre os dois grupos (Mann-Whitney, Z: -2,810, $p < 0,0052$).

TABELA 1
Distribuição dos valores das medianas e do 1º e 3º quartis referentes à contagem de células T-CD₄ e carga viral das gestantes portadoras do HIV

Grupo	1ª CV (p25-p75)	2ª CV (p25-p75)	P	1º TD4 (p25-p75)	2º TCD4 (p25-p75)	p
2	860 (600-3.400)	278 (40-2.923)	0,028 ^b	692 (502-895)	660 (574-862)	0,502
3	14.370 (6.726-45.610)	40 (40-1.499)	0,0001 ^b	399 (297-494)	543 (377-689)	0,0001 ^b
p	0,0001 ^a	0,3738		0,0001 ^a	0,0052 ^a	

^a $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney ^b $p < 0,05$, Teste pareado de Wilcoxon CV= Carga viral

Os dados da CV são expressos em cópias/mL Os dados dos linfócitos TCD4 são expressos em células/mm³

1ª CV e 1º TCD4 = Realizado entre 12-20 semanas 2ª CV e 2º TCD4 = Realizado entre 32-38 semanas

Os resultados referentes à evolução dos níveis plasmáticos da vitamina A durante a gravidez das pacientes dos três grupos avaliados estão na Tabela 2. Observou-se redução da vitamina A ao longo da gestação nas pacientes dos grupos 1 e 2 apenas. No grupo 3, a redução verificada não se traduziu significativa (Teste de Friedman, $p=0,41$).

TABELA 2

Distribuição dos valores das medianas e 1º e 3º quartis das dosagens plasmáticas de vitamina A em quatro diferentes períodos gestacionais

Grupo	12-20sem (p25-p75)	21-28 sem (p25-p75)	29-36 sem (p25-p75)	Puerpério (p25-p75)	p
1	38 (33-40)	31,5 (28-39)	31,25 (22-35)	25 (19-27)	0,016 ^a
2	37 (27-40)	31,75 (29-40)	30,5 (20-43)	24 (19-34)	0,010 ^b
3	34 (22-43)	30 (22-38)	29 (24-40)	23 (19-30)	0,412
*p	0,65	0,415	0,99	0,99	

^a $p \leq 0,05$ Retinol entre 12-20 semanas X Retinol puerpério. Teste não paramétrico de Friedman com o teste *post hoc* de Dunn.

^b $p \leq 0,05$ Retinol entre 12-20 semanas X retinol no puerpério. Teste não paramétrico de Friedman com o teste *post hoc* de Dunn.

* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os dados da vitamina A são expressos em $\mu\text{g/dl}$

No período de 12-20 semanas, observou-se hipovitaminose em 8,3%, 5% e 16% nas pacientes do grupo 1, 2 e 3, respectivamente. Houve redução progressiva da vitamina A plasmática materna nas pacientes deste estudo, atingindo durante o 3º trimestre níveis de hipovitaminose A nos grupos 1, 2 e 3 de 16,7%, 20% e 16% respectivamente. No período do puerpério imediato observou-se frequências de hipovitaminose em 25% das paciente do grupo 1, 29,4% nas pacientes do grupo 2 e 28,6% naquelas do grupo 3.

Na tabela 3 estão os resultados referentes à concentração da hemoglobina e da vitamina A do sangue do cordão umbilical e variáveis relacionadas ao recém-nascido, como a idade gestacional ao nascimento, peso, índices de Apgar de primeiro e quinto minutos e classificação antropométrica. De todas estas variáveis, a única que foi estatisticamente significativa foi a concentração de hemoglobina, mais baixa no sangue do cordão dos fetos do grupo 3 em relação ao Grupo Controle (Teste de Kruskal-Wallis: 6,867, $p=0,03$). Observou-se que os neonatos de gestantes do Grupo 2 e 3 apresentaram uma tendência a menores níveis de vitamina A em relação ao Grupo 1 (Teste de Kruskal-Wallis: 5,287, $p=0,07$).

TABELA 3

Distribuição dos valores das medianas e intervalos interquartis da hemoglobina (Hb) e da vitamina A do sangue do cordão umbilical de acordo com a idade gestacional no momento do parto (IG), peso, APGAR no 1º minuto (A1'), APGAR no 5º minuto (A5')

Grupo (p25-p75)	Hb (p25-p75)	Vitamina A (p25-p75)	IG (p25-p75)	Peso (p25-p75)	A1' (p25-p75)	A5'
1	15,2	24	38,6	3250	9	10
(14,3-16,7)	(19-29)	(38,0-39,2)	(2920-3408)	(8,0-9,5)	(9,5-10)	
2	14,75	18	38,1	3080	8	10
(14,0-15,8)	(11-21)	(37,5-40,0)	(2795-3260)	(7,5-9,0)	(10-10)	
3	14,1 ^a	18	38,5	3100	9	10
(13,1-15,0)	(10-22)	(38,0-39,5)	(2778-3300)	(8,0-9,5)	(9,5-10,0)	
p	0,031 ^a	0,07	0,571	0,447	0,07	0,80

^aHemoglobina grupo 3 X Hemoglobina grupo 1 = $p \leq 0,05$ (Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o teste *post hoc* de Dunn).

Os dados da Hemoglobina são expressos em g/dL

Os dados da vitamina A são expressos em $\mu\text{g/dl}$

A idade gestacional é expressa em semanas

O peso é expresso em gramas

TABELA 4

Coefficientes de associações obtidos entre o retinol do sangue do cordão umbilical e o peso e a hemoglobina (Hb) do recém-nascido nos três grupos estudados e a associação verificada entre a Hb do recém-nascido os níveis plasmáticos maternos de retinol

Grupo	1		2		3	
	*r	p	*r	p	*r	p
Peso do RN	0,771	0,01	0,378	0,13	0,420	0,06
Hb do RN	-,074	0,82	-,205	0,43	-,264	0,25
Retinol materno	0,650	0,02	0,222	0,37	0,410	0,05

*Coeficiente de correlação utilizado: Spearman

No período de 12-20 semanas observou-se associação entre os níveis de retinol materno e o tempo de duração da gestação nas pacientes do grupo 1 (Teste de Spearman, $r:0,63$ e $p=0,03$). No entanto, essa associação não foi observada com as pacientes do grupo 2 e com aquelas do grupo 3 (Teste de Spearman, $p > 0,20$). Adicionalmente, não se observou associação entre os níveis de retinol materno nesse período e a contagem de células T CD₄ nas gestantes do Grupo 2 (Teste de Spearman, $p=0,82$) enquanto uma tendência a essa associação é delineada para o Grupo 3 (Spearman, $p=0,08$). Também, não se evidenciou associação entre os níveis de retinol materno e carga viral no mesmo período (Teste de Spearman, $p>0,40$).

Houve correlação direta entre os níveis plasmáticos de vitamina A nas pacientes do grupo 1 no período de 21-28 semanas de gestação e a hemoglobina do sangue do cordão umbilical ao nascimento (Teste de Spearman, $r:0,65$ e $p=0,02$). Observou-se, também associação limítrofe na avaliação desses parâmetros nas pacientes do grupo 3 (Teste de Spearman, $r:0,41$ $p=0,05$). Entretanto, não se observou associação na análise dos mesmos parâmetros nas pacientes do grupo 2 (Teste de Spearman, $r:0,22$ e $p=0,37$).

Os dados referentes às associações entre a concentração de vitamina A no sangue do cordão umbilical com o peso do recém-nascido (RN) e com os níveis de hemoglobina do RN nos três grupos estudados estão na tabela 4. Em contraste aos resultados observados entre as gestantes do grupo controle, não se observou associação entre os níveis de retinol do cordão umbilical e o peso do recém-nascido em gestações do Grupo 2, enquanto uma tendência a essa associação foi observada em gestações do Grupo 3 (Teste de Spearman, $r:0,42$ e $p=0,06$). Não se detectou, também, associação entre a concentração de vitamina A e a concentração de hemoglobina no sangue do cordão umbilical ao nascimento (Teste de Spearman, $p>0,20$).

DISCUSSÃO

A vitamina A é particularmente necessária durante os períodos em que ocorrem rápida proliferação e diferenciação celular, tais como ocorrem durante a gestação e no início da infância (23,24). Ao presente estudo observou-se no grupo controle no período entre 12-28 semanas de gestação, níveis plasmáticos de vitamina A reduzidos em 8,3% das gestantes; em 16,7% das gestantes no período entre 29-36 semanas e em 25% das gestantes e recém-nascidos no puerpério imediato. Estes dados estão de acordo com a afirmativa de que a gravidez é identificada como um período de acentuada vulnerabilidade para o desenvolvimento de hipovitaminose A (8, 25).

Baseado em dados da literatura, a gestação, a infecção pelo vírus HIV e a raça negra têm sido fatores de risco observados para a deficiência dessa vitamina (9,26-28). Na presente casuística, observou-se que as concentrações plasmáticas de vitamina A são 13 $\mu\text{g/dl}$ inferiores aos níveis iniciais, com redução de 28% no grupo controle. No grupo 2 e 3 observam-se as mesmas tendências. A avaliação desses dados não identificou nenhuma diferença significativa entre os grupos, independente da associação com o HIV e uso de anti-retrovirais. A deficiência da vitamina A, mesmo considerando países desenvolvidos, tem sido detectada em porcentagens relativamente comuns (30%). Por sua vez, essa deficiência pode alcançar freqüências na ordem de 60% nos países em desenvolvimento quando avaliadas especificamente gestantes portadoras do HIV (9,28).

Os mecanismos responsáveis pelo decréscimo das concentrações plasmáticas de vitamina A durante a gestação são parcialmente conhecidos. Dentre os fatores considerados importantes na concentração de vitamina A no sangue materno cita-se a ingestão, a hemodiluição, a maior mobilização de vitamina A, a transferência através da placenta, a reserva hepática materna e a má nutrição. A ação hormonal, os ajustes metabólicos da gestante necessários à manutenção da gravidez e ao próprio aporte extra de vitamina A são as variáveis responsáveis pelo risco aumentado de deficiência materna dessa vitamina, principalmente na fase final da gestação, onde é intensa a transferência dessa vitamina para o feto (29-31).

A relação entre os níveis plasmáticos maternos de vitamina A e os dos recém-natos tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores e os achados, freqüente contraditórios. A proporção da concentração plasmática de vitamina A do sangue materno em relação ao sangue fetal é de aproximadamente 2:1. Em condições de carência marginal ou deficiência materna, a concentração fetal ou do cordão umbilical ao nascimento pode ser mantida dentro dos limites normais e até mesmo exceder os valores maternos (11, 31). O mecanismo e a regulação da transferência placentária de

vitamina A, assim como as conseqüências da deficiência deste nutriente durante a gestação em humanos, não estão bem estabelecidos (32).

Observou-se no grupo 1 hipovitaminose A em 16,7% das gestantes no terceiro trimestre, 25% das puérperas e 25% dos RNs considerados clinicamente normais. Em concordância com esses achados, estudo conduzido com gestantes de baixo risco na cidade do Rio de Janeiro comprovou inadequação dos níveis séricos de vitamina A em 12,5% das gestantes no terceiro trimestre de gestação (33) e em 28,6% dos recém-nascidos, no sangue do cordão umbilical (32). No entanto, esse último, observou também inadequação dessa vitamina em 9,1% das puérperas avaliadas. A transferência de vitamina A para o feto ocorre por difusão simples, ligada a um complexo protéico envolvendo duas proteínas, a pré-albumina (transretina) e a proteína carreadora do retinol. A primeira serve para solubilizar a molécula de retinol e prevenir a filtração glomerular de proteína carreadora do retinol evitando a perda de vitamina A na urina. A reserva hepática fetal depende da transferência placentária desta vitamina. Relaciona-se às proteínas descritas e está associada com a deglutição do líquido amniótico, que representam as primeiras fontes de vitamina A para o feto (34).

Os resultados deste trabalho demonstram níveis plasmáticos de vitamina A do sangue do cordão umbilical do grupo 1, $25\text{ }\mu\text{g/dl} \pm 3,85\text{ }\mu\text{g/dl}$. Obteve-se $24\text{ }\mu\text{g/dl} \pm 2,75\text{ }\mu\text{g/dl}$ para o grupo 2 e $23\text{ }\mu\text{g/dl} \pm 5,75\text{ }\mu\text{g/dl}$ para o grupo 3. Em contraste a determinados achados (32), não se observou associação significativa entre os níveis plasmáticos de retinol materno com os níveis de retinol no cordão umbilical. Entretanto, baixa concentração de vitamina A no sangue de cordão ao nascimento vem sendo considerada como condição fisiológica do recém-nascido (35-37). Alguns estudos também não demonstraram influência dos níveis plasmáticos maternos de vitamina A sobre a concentração dessa vitamina na unidade feto-placentária ao nascimento (30,38,39).

O estoque fetal de vitamina A é constituído ao longo da gestação, principalmente no 3º trimestre. Supõe-se, portanto, que a deficiência severa nessa etapa de desenvolvimento fetal possa repercutir no estado nutricional de vitamina A fetal (11,30). Em contraste aos resultados observados no grupo 1, não se observou associação da vitamina A do recém-nascido (RN) dos grupo 2 com o peso ao nascimento, enquanto uma tendência a essa associação já é vislumbrada para o grupo 3. Pelo menos três grupos de pesquisadores observaram a associação entre baixas concentrações de vitamina A no cordão umbilical e o crescimento anormal do feto (11,31,32). Alguns pesquisadores observam que as crianças nascidas de mães com carência de vitamina A e infectadas por HIV apresentaram consistentemente menor peso e comprimento para a idade gestacional quando comparadas com crianças nascidas de mães infectadas e sem carência de vitamina A (11). As

possíveis explicações para os níveis reduzidos de vitamina A no córdão de recém-nascidos com restrição de crescimento intra-uterino podem refletir: a) a oferta inadequada de vitamina A pela mãe, secundária a comprometimento da circulação útero-placentária; b) baixo poder de ligação de vitamina A pelo feto, devido às baixas concentrações da proteína carreadora do retinol através do tecido placentário resultando em redução na captação da vitamina A pelo fígado fetal; c) maior utilização de vitamina A pelo feto, relacionada à presença de infecções intra-uterinas, pois as infecções agudas e crônicas aumentam a taxa catabólica e a excreção de vitamina A; d) armazenamento insuficiente e inadequado de vitamina A no fígado fetal, relacionado à presença de anormalidades estruturais e funcionais no fígado de recém-nascido com restrição de crescimento intra-uterino, sendo estas alterações possivelmente associadas com a depleção das células hepáticas armazenadoras de vitamina A (40).

A presente casuística não observou diferenças na avaliação do peso e da adequação antropométrica neonatal entre os RN dos grupos estudados. Na avaliação antropométrica de crianças expostas e não portadoras do HIV há evidências de que a deficiência de vitamina A durante a gestação já possa ter efeito deletério a longo prazo sobre o crescimento e desenvolvimento das crianças (11).

Alguns autores demonstram que, durante a gestação, a hipovitaminose A associa-se a reservado prognóstico gestacional, inferindo-se que a vitamina A seja importante para o crescimento e para o desenvolvimento fetal adequados. Essa deficiência associar-se-ia com desenvolvimento embriogênico anormal, aborto espontâneo, anemia e imunodepressão (23,24). Houve alta correlação nas gestantes do grupo 1 entre o retinol materno durante 21-28 semanas e a hemoglobina fetal no momento do parto ($p=0,002$). Adicionalmente, houve associação limítrofe entre essas variáveis no grupo exposto à terapia triplíce, em contraste ao observado no grupo 2. A possível explicação para a associação entre o retinol e a hemoglobina fetal provém de estudos que demonstram a necessidade da vitamina A para a absorção e utilização de ferro inorgânico não-heme, com conseqüente limitação de sua utilização e redução dos níveis hematimétricos (41). Acredita-se também, que essa vitamina esteja envolvida na síntese de hormônios esteróides, uma vez que a suplementação da vitamina A tem sido associada a aumento dos níveis de progesterona (24). Outra associação sugerida por observações preliminares é a associação entre os baixos níveis de β -caroteno em mulheres e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia e eclâmpsia. Sugere-se que a vitamina A atue na prevenção de lesão endotelial, um dos fatores causais das síndromes hipertensivas da gravidez (10,42). No entanto, essas observações não foram sustentadas em um estudo recente com 736 gestantes (8).

Tem-se demonstrado que a vitamina A tem sido

relacionada ao trabalho de parto pré-termo (7,9) possivelmente secundária à alteração hormonal ou devido a maior predisposição a processos infecciosos. Na presente casuística, não se observou associação entre a vitamina A plasmática e o tempo de duração da gestação nas gestantes portadoras do HIV em uso de esquemas contendo AZT exclusivamente ou terapia tríplice:

Em pacientes portadores da infecção pelo HIV, ainda se desconhece a real influência dos fatores nutricionais e sobretudo dos micronutrientes sobre o prognóstico da infecção. Parece ser um importante fator de risco norteador da evolução da doença pelo vírus HIV (7). Estudos recentes têm demonstrado associação consistente entre a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e deficiência de vitamina A (12,43-45). Essa associação tem sido verificada tanto no aumento de incidência de infecção sintomática pelo HIV em adultos quanto no incremento das taxas de transmissão vertical (7,9,13,15,28,44-47). Na casuística aqui apresentada, não se evidenciou nenhum caso de transmissão perinatal, talvez decorrente dos cuidados com a aderência às medidas profiláticas ou decorrentes do número limitado de casos para este tipo de avaliação.

Pacientes infectadas pelo HIV e com deficiência de retinol apresentam tendência a menor sobrevivência quando se compara com pacientes sem hipovitaminose A (12). Alguns estudos observaram que tanto o nível plasmático de vitamina A quanto o número de linfócitos TCD₄ eram fatores preditivos independentes de transmissão vertical (TV) do HIV, seja afetando a integridade placentária, aumentando a viremia sanguínea, a viremia no leite materno ou acentuando a excreção cervical do vírus (9,12,43,46,48). Alguns trabalhos, entretanto, não confirmam estas assertivas. Sob essa perspectiva, outros estudos não encontraram correlação entre baixo nível sérico de vitamina A e o aumento da transmissão vertical (13-15).

Na tentativa de elucidar a real associação da vitamina A com a TV do HIV alguns pesquisadores realizaram a suplementação de vitamina A às gestantes portadoras do HIV (5,49-51). Altas doses de suplementação oral de β -caroteno têm aumentado o número de linfócitos TCD₄ tanto em pacientes imunocompetentes como naqueles portadores do HIV. Segundo Greenberg et al (9), parece que essa suplementação age como cofator para a redução da dose efetiva do anti-retroviral favorecendo a recuperação contra infecções oportunistas. Outros autores, entretanto, não confirmaram a associação entre a suplementação da vitamina A e o retardo na progressão da doença pelo HIV (52). Um importante estudo duplo-cego, placebo controlado realizado na Tanzânia não evidenciou associação entre a suplementação de vitamina A e a melhora no número de linfócitos TCD₄ e nem com os resultados perinatais, fortemente representados pelo peso do RN, ocorrência de parto pré-termo, restrição do crescimento

intra-uterino e morte fetal (50). No entanto, a suplementação da vitamina A não foi avaliada simultânea e adequadamente com os níveis plasmáticos dessa vitamina. Objetivando avaliar a associação entre os níveis plasmáticos de vitamina A e o prognóstico imunológico materno, a presente casuística não detectou associação entre os níveis de linfócitos TCD₄ e o retinol materno nos grupos estudados, confirmando outro estudo que delineou a mesma tendência, porém entre pacientes com maioria masculina (53). Entretanto, a estabilidade da concentração plasmática de retinol materno demonstrada durante a gestação de mulheres do Grupo 3 pode sugerir que o uso de esquemas combinados de anti-retrovirais atuaram favoravelmente e de forma indiscutível para a melhora imunológica dessas gestantes, o que é demonstrado com o aumento significativo dos linfócitos TCD₄ nessas gestantes e também com a inegável relação entre os fatores nutricionais e a resistência a infecções.

Estudos *in vitro* sugerem que durante a infecção pelo HIV, a vitamina A suprime a replicação viral, inibindo a transcrição viral do HIV. Essa supressão ocorre porque certas proteínas específicas de ligação ao retinol ligam-se ao core viral (52,54-56). No entanto, a análise cautelosa da associação da carga viral com deficiência de vitamina A não tem se mostrado consistente (15,52). Não se observou, no presente estudo, associação entre os níveis de carga viral e os níveis plasmáticos maternos de vitamina A. Nesse sentido, em 1998, Semba et al (53) não encontraram associação entre a carga viral do HIV com a suplementação da vitamina A (47).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da reconhecida limitação da avaliação isolada do indicador bioquímico como sinalizador de hipovitaminose A, frente os dados apresentados, podemos demonstrar alta prevalência de reduzidos níveis plasmáticos de vitamina A nas pacientes do estudo. Na presente casuística, demonstrou-se que gestantes usuárias de esquemas combinados de anti-retrovirais não apresentaram redução significativa dos níveis de retinol materno durante a gestação, possivelmente pela melhora imunológica que essas medicações determinam. Não observamos associação entre os níveis plasmáticos de retinol materno e a duração da gestação em gestantes portadoras do HIV, entretanto já se verifica uma associação entre os níveis plasmáticos maternos de retinol e a hemoglobina do neonato ao nascimento. Adicionalmente, já podemos observar uma tendência à associação dos níveis de retinol do cordão umbilical e o peso do recém-nascido.

Convém lembrar que, até o momento, nenhum trabalho da literatura forneceu evidência clara de que a suplementação materna com vitamina A estivesse associada com redução da TV do HIV em gestantes com este tipo de deficiência (49,51,57,58). No entanto, permanecem dúvidas sobre a

efetividade dessa medida entre gestantes com deficiência dessa vitamina, especialmente naquelas com contagem de linfócitos TCD₄ reduzida. Em vista dessas assertivas, é prudente corrigir as possíveis deficiências subclínicas da vitamina A em gestantes portadoras do HIV-1, cuidando para não expô-la a excesso desta vitamina, o que pode acarretar em risco teratogênico (11, 59).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sônia Aparecida Cambréia Furlan pela dedicação e colaboração deferidas às dosagens do material do estudo. Agradecemos também à Maria Albina V. Bortolheiro pelo apoio técnico dispensado durante o período do corrente estudo.

REFERÊNCIAS

- Barreto ML, Santos LM, Assis AM, Araújo MP, Farenzena GG, Santos PA, Fiaccone RL. Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory-tract infection in Young children in Brazil. *Lancet* 1994; 344: 228-31.
- World Health Organization. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva: WHO; 1996.
- World Health Organization. Global prevalence of vitamin A deficiency. Geneva: WHO; 1995.
- Ramalho RA, Flores H, Saunders C. Hypovitaminosis A in Brazil: a public health problem. *Rev Panam Salud Publica* 2002;12:117-22.
- UNICEF. United Nations Children's Fund. & WHO. World Health Organization. Statement by UNICEF and WHO on interpretations of policy implications of some presentation made. *News Lett* 1997; 4:30.
- Christian P, West KP Jr, Khattry SK, Kimbrough-Pradhan E, LeClerq SC, Katz J et al. Night blindness during pregnancy and subsequent mortality among women in Nepal: effects of vitamina A and β -carotene supplementation. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 542-7.
- Semba RD; Graham NMH, Caiaffa WT. Increased mortality associated with vitamin A deficiency during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2149-2154.
- Radhika MS, Bhaskaram P, Balakrishna N, Ramalakshmi BA, Devi S, Siva Kumar B. Effects of vitamin A deficiency during pregnancy on maternal and child health. *BJOG* 2002; 19:689-93.
- Greenberg BL, Semba RD, Vink PE, Farley JJ, Sivapalasingam M, Steketee RW et al. Vitamin A deficiency and maternal-infant transmission of HIV in two metropolitan areas in the United States. *AIDS* 1997; 11: 325-32
- Ramakrishnan V, Manjrekar R, Rivera J. Micronutrients and pregnancy outcome: a review of the literature. *Nutr Res* 1999; 19: 103-59.
- Azais-Braesco V & Pascal G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1325S-33S.
- Figueiredo JF, Lorenzato MM, Silveira SA, Passos AD, Rodrigues MD, Galvão LC, Vannucchi H. Survival and infectious processes in patients with AIDS: analysis based on initial serum vitamin A levels. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 429-435.
- Burns DN, Fitzgerald G, Semba R. Vitamin A deficiency and other nutritional indices during pregnancy in human immunodeficiency virus infection: prevalence, clinical correlates and outcome. Women and Infants Transmission Study Group. *Clin Infect Dis* 1999; 29:328-334.
- Wiratchai A, Phuapradit W, Sunthornkachit R, Chaovavanich A, Tantanathip P, Puchaiwatananon O. Maternal and umbilical cord serum vitamin A, E levels and mother-to-child transmission in the non-supplemented vitamin A, E HIV-1 infected parturients with short-course zidovudine therapy. *J Med Assoc Thai*. 1999; 82:885-90.
- Phuapradit W, Panburana P, Jaovisidha A, Puchaiwatananon O, Chantratita W, Bhodhiphala P, et al. Plasma HIV-1 RNA viral load and serum vitamin A and E levels in HIV-1 infected pregnant women. *Aust NSJ Obstet Gynaecol* 2000; 40(1): 78-80.
- Saunders C, Ramalho RA, Leal MC. Estado nutricional de vitamina A no grupo materno-infantil. *Rev Bras Saúde Materno Infantil* 2001; 1: 21-9.
- Stein D. Tipos de estudos epidemiológicos. *Jornal da AMRIGS* 1999, 10:41-4.
- El Beitune P, Duarte G, Morais EN, Quintana SM, Vannucchi H. Deficiência da vitamina A e associações clínicas: Revisão. *Arch Latinoamer Nutr* 2003; 53(4):355-63.
- Perinatal HIV Guidelines Working Group Members. Public Health Service Task Force Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1 Infected Women for Maternal Health and Intervention to Reduce Perinatal HIV-1 Transmission in the United States 2000. Se consigue en: URL:<http://www.hivatis.org>. Fecha de acceso: 21/05/2001.
- Neeld JB, Pearson WN. Macro and Micromethods for the determination of serum vitamin A using trifluoroacetic acid. *J Nutr* 1979; 454-62.
- Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. Intrauterine Growth as Estimated from Liveborn Birth-Weight data at 24 to 42 weeks of Gestation. *Pediatrics* 1963; 32:793-800.
- de Pee S, Dary O. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J Nutr* 2002; 132(9 Suppl):2895-901.
- Diniz AS. Combate à deficiência de vitamina A: linhas de ação e perspectivas. *Rev Bras Saúde Materno Infantil* 2001; 1: 31-6.
- Mahan LK, Stump SE. What is a vitamin? En: KRAUSE'S. Food Nutrition, & Diet Therapy. W.B. 10ª ed. Philadelphia: Saunders Company; 2000. p68-109.
- Dolinsky M. Avaliação do estado nutricional de vitamina A de gestantes atendidas em uma maternidade pública do município do Rio de Janeiro [tesis doctoral]. Rio de Janeiro: Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1999.
- Wallingford JC, Underwood BA. Vitamin A deficiency in pregnancy. In *vitamina A deficiency and its control*. Bauernfeind JC, ed. Orlando: Academic Press; 1986. p.101-52.
- Duistman PK, Cook LR, Tanumihardjo AS, Olson JÁ. Vitamin A inadequacy in socioeconomically disadvantaged pregnant lowan women as assessed by modified relative dose response test. *Nutr Res* 1995; 15:1263-76.

28. Nimmagadda A, O'Brien WA, Goetz MB. The significance of vitamin A and carotenoid status in persons infected by the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 711-8.
29. Katz J, Khatry SK, West KP, Humphrey JH, Leclercq SC, Kimbrough E, et al. Night blindness is prevalent during pregnancy and lactation in rural Nepal. *J Nutr* 1995; 125: 2122-7.
30. Underwood B. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. *Am J Clin Nutr* 1994; 59 Suppl:517-24.
31. Rondo PH, Abbott R, Rodrigues LC, Tomkins AM. Vitamin A, folate, and iron concentrations in cord and maternal blood of intra-uterine growth retarded and appropriate birth weight babies. *Eur J Clin Nutr*. 1995; 49:391-9.
32. Ramalho RA, Anjos LA, Flores H. Estado nutricional de vitamina A no binômio mãe/Recém-nascido em duas maternidades no Rio de Janeiro, Brasil. *Arch Latinoam Nutr* 1999; 49:318-21.
33. Accioly E. Avaliação do estado nutricional de vitamina A em gestantes assistidas em maternidade da rede pública no município do Rio de Janeiro [tesis doctoral]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1999.
34. Rondo PH, Abbott R, Rodrigues LC, Tomkins AM. The influence of maternal nutritional factors on intrauterine growth retardation in Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1997; 11:152-66.
35. Agarwal DK, Singh SV, Gupta V, Agarwal KN. Vitamin A status in early childhood diarrhoea, respiratory infection and in maternal and cord blood. *J Trop Pediatr* 1996; 42:12-4.
36. Basu TK, Wein EE, Gangopadhyay KC, Wolever TMS, Godel JC. Plasma vitamin A and retinol-binding protein in newborns and their mother. *Nutr Res* 1994; 14:1297-303.
37. Godel JC, Basu TK, Pabst HF, Hodges SR, Hodges PE, Margaret LNg. Perinatal vitamin A status of Northern Canadian mothers and their infants. *Biol Neonate* 1996; 69:133-9.
38. Coutosoudis A, Adhikari M, Coovadia HM. Serum vitamin A concentrations and association with respiratory disease in premature infants. *J Trop Pediatr* 1995; 44:230-3.
39. Moore T. Vitamin A transfer from mother to offspring in mice and rats. *Int J Vitamin Nutr Res* 1971; 41:301-6.
40. Rondó PHC, Abbott R, Tomkins AM. Vitamina A e retardo de crescimento intra-uterino. *J Pediatr* 1997; 73: 335-9.
41. Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JE, Wallace DL, Rucker RB, Mejia LA et al. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 1978; 31:876-85.
42. Kahhale S. Síndromes hipertensivas. En: Zugaib M, Tedesco JJA, Quayle J, editors. *Obstetrícia psicossomática*. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 191-6.
43. Kreiss J. Breastfeeding and vertical transmission of HIV-1. *Acta Paediatr* 1997; 421:113-7.
44. Baum MK, Shor-Posner G, Bonvehi P, Cassetti I, Lu Y, Mantero-Atienza E, et al. Influence of HIV infection on vitamin A status and requirements. *Ann NY Acad Sci* 1992; 669:165-73.
45. Beach RS, Mantero-Atienza E, Shor-Posner G, Javier JJ, Szapocznik J, Morgan R, et al. Specific nutrient abnormalities in asymptomatic HIV-1 infection. *AIDS* 1992; 6:701-8.
46. Semba RD, Miotti P, Chipangwi JD, Henderson R, Dallabetta G, Yang LP, et al. Maternal vitamin A deficiency and child growth failure during human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14:219-22.
47. Semba RD, Lyles CM, Margolick JB, Caiaffa WT, Farzadegan H, Cohn S, et al. Vitamin A supplementation and human immunodeficiency virus load in injection drug users. *J Infect Dis* 1998; 177: 611-6.
48. Nduati RW, John GC, Richardson BA, Overbaugh J, Welch M, Ndinya-Achola J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infected cells in breast milk: association with immunosuppression and vitamin A deficiency. *J Infect Dis* 1995; 172: 1461-8.
49. Coutosoudis A, Pillay K, Spooner E, Kuhn L, Coovadia HM. Randomized trial testing effect of vitamin A supplementation on pregnancy outcomes and early mother-to-child HIV-1 transmission in Durban, South Africa. *AIDS* 1999; 13: 1517-24.
50. Fawzi WW, Msamanga GI, Spiegelman D, Urassa EJ, McGrath N, Mwakagile D, et al. Randomized trial of effects of vitamin supplements on pregnancy outcomes and T cell counts in HIV-1 infected women in Tanzania. *Lancet* 1998; 351: 1477-82.
51. Fawzi WW, Msamanga G, Hunter D, Urassa E, Renjifo B, Mwakagile D, et al. Randomized trial of vitamin supplements in relation to vertical transmission of HIV-1 in Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23: 246-54.
52. Kennedy CM, Coutosoudis A, Kuhn L, Pillay K, Mburu A, Stein Z, et al. Randomized controlled trial assessing the effect of vitamin A supplementation on maternal morbidity during pregnancy and postpartum among HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 24: 37-44.
53. Silveira SA, Figueiredo JF, Jordão-Jr A, Unamuno R, Rodrigues M, Vannucchi H. Malnutrition and hypovitaminosis A in AIDS patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32: 119-124.
54. Coutosoudis A, Broughton M, Coovadia HM. Vitamin A supplementation reduces measles morbidity in young African children: a randomized, placebo-controlled double blind trial. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:890-5.
55. Guo WX, Gill PS, Antakly T. Inhibition of AIDS-Kaposi's sarcoma cell proliferation following retinoic acid receptor activation. *Cancer Res* 1995; 55:823-9.
56. Sawaya BE, Rohr O, Aunis D, Schaeffer E. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 gene transcription by nuclear receptors in human brain cells. *J Biochem* 1996; 271:22895-900.
57. Shey WI, Brocklehurst P, Sterne JÁ. Vitamin A supplementation for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; (3):CD003648.
58. Burger H, Kovacs A, Weiser B, Grimson R, Nachman S, Tropper P, et al. Maternal serum vitamin A levels are not associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14: 321-6.
59. El Beitune P, Duarte G, Quintana SM. Hipervitaminose A - Algumas Considerações. *J Bras Med* 2004; 86:29-30.

Recibido: 09-09-2003

Acceptedo:06-09-2004

Prevalencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica

Melvin Calvo, Melissa Carazo, María Laura Arias, Carolina Chaves, Rafael Monge y Misael Chinchilla

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Instituto Costarricense de Investigación
y Enseñanza en Nutrición y Salud

RESUMEN. La presencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios y los niveles de coliformes fecales fueron determinados en lechuga, apio, cilantro, fresas y moras adquiridas en ferias del Agricultor del Valle Central de Costa Rica, con el fin de establecer el riesgo de transmisión de estos microorganismos y otros patógenos a partir del consumo de productos crudos. Durante el Segundo semestre del 2001 y primero del 2002, 50 muestras de cada producto fueron evaluadas, 25 durante la estación seca y 25 durante la estación lluviosa y provenientes de cinco diferentes ferias del Agricultor. El recuento de coliformes fecales fue realizado de acuerdo a la técnica recomendada por Vanderzant & Splittstoesser. La determinación de parásitos fue hecha utilizando las tinciones de Ziehl Nielsen y Weber a partir de un sedimento obtenido por el lavado de los productos mencionados, usando agua peptonada estéril 0,1% y centrifugando a 900 G por 15 min. 100% de las muestras de vegetales presentaron coliformes fecales, y la mayor prevalencia fue obtenida durante la estación lluviosa. A pesar de que todos los vegetales presentaron coliformes fecales en altas concentraciones, la lechuga y cilantro presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la estación lluviosa y la seca, siendo mayor durante la estación lluviosa. No se detectó coliformes fecales en fresas y moras probablemente debido a su bajo pH. Todos los productos evaluados presentaron, aunque sea una vez, *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp. y microsporidios, demostrando el riesgo que representan para la Salud Pública. *Cryptosporidium* sp. estuvo presente en todos los productos excepto fresas. Los microsporidios fueron aislados de todos los productos excepto moras y *Cyclospora* sp. únicamente fue aislado de lechuga durante la estación seca. Los resultados demuestran la importancia de introducir en el país las Buenas Prácticas Agrícolas, especialmente debido a la resistencia de *Cyclospora* sp. y *Cryptosporidium* sp. a agentes desinfectantes.

Palabras clave: *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios, coliformes fecales, vegetales, frutas.

SUMMARY. Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. The presence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp. and microsporidia and the levels of fecal coliforms were determined in lettuce, parsley, cilantro, strawberries and blackberries acquired in local agricultural markets of the Central Valley of Costa Rica, in order to establish the possible transmission risk of these microorganisms and other pathogens from the consumption of these raw products. During the second semester of 2001 and the first of 2002, 50 different samples of each product, 25 taken in the dry season and 25 in the rainy season and coming from five different local agricultural markets were evaluated. The fecal coliforms count was done according to the technique recommended by Vanderzant & Splittstoesser. The parasite determination was done using Ziehl Nielsen and Weber staining techniques from a sediment obtained through the rinse of the mentioned products, using sterile peptonated water 0,1% and centrifuging at 900 G for 15 min. One hundred per cent of vegetable samples had fecal coliforms and the greatest prevalence was obtained during the rainy season. Although all vegetables presented fecal coliforms in high concentrations, lettuce and cilantro presented statistical difference between rainy and dry season, being greater during the rainy season. Fecal coliforms were not detected in strawberries and blackberries probably due to its low pH. All products evaluated presented, at least once, *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp. and microsporidia, showing the risk they represent to Public Health. *Cryptosporidium* was present in all products but strawberries. Microsporidia was present in all products except blackberries and *Cyclospora* was only isolated from lettuce during the dry season. These results show the importance of introducing in the country Good Agricultural Practices, especially due to the resistance of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* to disinfecting agents.

Key words: *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidia, fecal coliforms, vegetables, fruits.

INTRODUCCION

Actualmente el consumo de frutas y vegetales es promovido como estrategia para reducir el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer (1). No obstante, debido a las

prácticas seguidas durante su cultivo, cosecha y comercialización, tales alimentos pueden representar un foco de microorganismos patógenos. Bacterias como *Salmonella* sp., *Aeromonas* sp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Bacillus*

cereus, entre otras, han sido frecuentemente aisladas de frutas y vegetales e identificadas como responsables de brotes de gastroenteritis o listeriosis (2). Además virus como Hepatitis A, Norwalk y algunos parásitos como *Lamblia intestinalis* y *Entamoeba histolytica* han sido responsables de diversos cuadros infecciosos vinculados con el consumo de alimentos (2). Recientemente *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* sp. y los Microsporidios han emergido como importantes patógenos vinculados con alimentos (2).

Desde su descripción en 1986, *Cyclospora cayetanensis*, ha sido ampliamente reconocido como agente causal de diarrea. Los humanos son infectados por la ingestión de ooquistes esporulados y presentan las manifestaciones clínicas en un período que oscila entre 2 a 11 días después de la exposición al microorganismo (3). No obstante, se han reportado períodos de incubación de tan solo 12 a 24 horas (4). A la fecha se desconoce la dosis infectante de este coccidio, sin embargo se presume que ésta debe ser baja (3).

La transmisión de *Cyclospora cayetanensis* por agua ha sido documentada en diversos estudios en los Estados Unidos y Nepal. (4-5). También se ha demostrado la transmisión de este coccidio por alimentos siendo la frambuesa, lechuga y albahaca, los más involucrados como vehículos del microorganismo (3,6). Ningún brote ha sido asociado con alimentos congelados o cocinados.

Se ha observado una marcada estacionalidad de la infección por *Cyclospora cayetanensis* en diferentes países, a pesar de las diferencias climatológicas, lo cual aún está sin explicarse; sin embargo parece estar relacionado en parte a las fluctuaciones en la temperatura y la humedad (3). Una situación similar se ha observado con *Cryptosporidium* sp. pues la mayor incidencia de infección con este parásito también ocurre durante los meses más calientes y húmedos (7).

Cryptosporidium sp. es un coccidio que parasita sobre las células de mucosa gastrointestinal de una gran variedad de vertebrados, incluyendo al hombre. La diarrea acuosa y profusa constituye la principal característica de la criptosporidiosis (8). Se ha sugerido que algunas personas pueden desarrollar la enfermedad después de la ingestión de tan solo un ooquiste (8). Esto explica la elevada tasa de ataque (mayor a 62%) observada en los diferentes brotes (9,10).

Un reciente informe identificó la cidra de manzana como la causa de una epidemia de criptosporidiosis (11). Según algunos autores, esto indica que las manzanas y otras frutas pueden ser potenciales vectores de diarrea (12). Además la elevada prevalencia de *Cryptosporidium* sp. en las aguas de irrigación de vegetales, sugiere fuertemente el papel de estos alimentos en la transmisión del parásito (13). Estudios realizados en Costa Rica han evidenciado una prevalencia del 5% de este coccidio en cilantro, del 2,5% en lechuga y del 1,2% en pepino, rábano y zanahoria (14).

La presencia de *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora cayetanensis* en frutas y vegetales es de considerable importancia para la salud pública, pues el lavado de estos alimentos y la desinfección de los mismos no logra eliminar ninguno de los dos microorganismos (13).

Los microsporidios son otros de los agentes emergentes responsables de brotes de diarrea. El número de microsporidios requerido para causar enfermedad en humanos se desconoce; no obstante, la inoculación de tan solo 100 esporas pueden causar enfermedad letal en individuos de laboratorio con deficiencia de células T (15).

A la fecha, no existe información disponible sobre la transmisión de microsporidios por alimentos. Sin embargo, estos parásitos han sido responsables de brotes de diarrea asociados al consumo de agua. Estos hallazgos han sido básicamente informados en Francia y en los Estados Unidos (15).

Es abundante la evidencia científica que confirma la transmisión por agua de los tres parásitos antes mencionados. Esto es de vital importancia en Costa Rica, pues las aguas de irrigación utilizadas sobrepasan considerablemente los niveles sanitarios sugeridos por la Organización Mundial de la Salud (10³/ 100mL coliformes fecales) (16). Por otro lado, la prevalencia de microsporidios y *Cyclospora cayetanensis* en vegetales frescos y frutas es desconocida, así como se carece de información sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* sp. en estos productos. Sin embargo, se ha reportado su aislamiento a partir de aguas superficiales costarricenses (17).

Dado lo anterior, se pretende con este trabajo determinar la prevalencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios y coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo frecuente en Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS

Localización del proyecto

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología de Alimentos y Aguas y de Protozoología de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica durante un período que comprendió los meses de octubre, noviembre y diciembre del año 2001 (125 muestras); y enero, febrero y marzo del año 2002 (125 muestras).

Selección de los sitios de muestreo

Se utilizaron 5 diferentes Ferias del Agricultor previamente seleccionadas. Estas fueron determinadas por probabilidad proporcional al tamaño entre aquellas que se realizan los sábados en el Valle Central. Las ferias se clasificaron de acuerdo al número de vendedores en las siguientes categorías: 1. pequeñas, menos de 100, medianas, entre 100-200, y grandes, más de 200. Las ferias seleccionadas fueron: Heredia, Tibás, Guadalupe, Naranjo y Desamparados.

Muestras

Se analizaron 25 muestras de cada producto (lechuga, apio, cilantro, fresas y moras) durante la estación lluviosa del 2001 (agosto, setiembre y octubre) y otras 25 muestras durante la estación seca del 2002 (enero, febrero y marzo). Durante cada período de estudio se tomó, por feria, una muestra de 5 unidades de cada producto, una por puesto de venta.

Análisis microbiológico

Las muestras se procesaron por la técnica de lavado (18), con 225 mL de agua peptonada al 0.1% siguiendo la técnica de recuento en placa para coliformes fecales recomendada por Vanderzant y Splittstoesser (18).

El líquido restante del enjuague se centrifugó a 900G por 15 minutos. El sedimento se utilizó para la determinación de los parásitos de interés. El diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. se efectuó empleando la técnica de Koster modificada (19) y la determinación de *Cyclospora cayetanensis* se llevó a cabo mediante la tinción de Ziehl-Nielsen modificada (20). Para la identificación de microsporidios se realizó con la técnica de Weber (21).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las enfermedades de origen alimentario han sido reconocidas a nivel mundial como de alta prioridad debido al elevado potencial que los alimentos poseen en la emergencia o reemergencia de amenazas microbiológicas para la salud (22). Se estima que las enfermedades de origen alimentario causan por año 76 millones de enfermos, 325.000 hospitalizaciones y 5.000 mil muertes sólo en los Estados Unidos (23).

Los resultados microbiológicos obtenidos a partir del análisis de 250 muestras de hortalizas y frutas de consumo crudo en nuestro país reflejan que el 100% de las muestras de hortalizas presentaron coliformes fecales en concentraciones superiores a 10^4 UFC/g, mientras que las frutas resultaron negativas para este parámetro (<10 UFC/g). Es importante considerar que los valores obtenidos en hortalizas no incluye la carga de coliformes fecales obtenidos en su raíz, ya que esta parte del producto fue eliminada antes de procesar las muestras.

La concentración promedio de coliformes fecales en hortalizas fue mayor durante la estación lluviosa que en la estación seca (Tabla 1). Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para la lechuga y cilantro, al comparar la carga de coliformes fecales durante la estación lluviosa y la seca. Este dato es divergente a resultados de un estudio anterior hecho en Costa Rica donde se determinó una mayor contaminación fecal en la estación seca (14). No obstante, esta diferencia resalta no sólo que en nuestro país la calidad sanitaria de las aguas utilizadas para la irrigación es inaceptable

(24), sino también la influencia de muchos factores adicionales, incluyendo cultivo, transporte, manejo, almacenaje y prácticas agrícolas que acarrearán contaminación a los productos. La importancia del incremento en la carga bacteriológica por factores ajenos a la producción y la irrigación, también ha sido demostrada por otros estudios, en los que se ha determinado mayores niveles de coliformes fecales en los productos que se encuentran en venta comparado con los que se analizaron directamente de las áreas de cultivo, demostrado así la importancia de la contaminación postcultivo (23).

TABLA 1

Promedio de coliformes fecales/gramo en hortalizas y frutas de las Ferias del Agricultor del Valle Central durante la estación lluviosa 2001 y seca 2002.

Producto	Promedio UFC/g	
	Estación Lluviosa (n= 25)	Estación Seca (n= 25)
Lechuga	$7,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
Apio	$3,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
Cilantro	$6,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
Fresas	<10	<10
Moras	<10	<10

Por otro lado, se debe destacar que para las fresas y moras, no se obtuvo ningún crecimiento de coliformes fecales, ni siquiera a partir de la solución inicial de lavado de las muestras. Esta ausencia de coliformes fecales pone de manifiesto la protección natural que estos productos poseen debido probablemente al bajo pH que presentan, siendo este de aproximadamente 3,86 para fresas y 2,86 para las moras, en contraste con los valores cercanos a pH neutro obtenido para la lechuga, culantro y apio en los cuales se favorecen el crecimiento bacteriano como se ha podido observar.

En cuanto a la prevalencia de *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis* y microsporidios en hortalizas y frutas, los resultados obtenidos evidencian el riesgo que existe, ya que en todos los productos se encontró al menos uno de estos microorganismos (Tabla 2).

Los microsporidios fueron aislados de todos los productos analizados excepto las moras. La lechuga fue el producto que presentó mayor porcentaje de positividad (32%), seguida por el cilantro (4%) y el apio y las fresas (2%). Estos resultados ponen de manifiesto la alta probabilidad de contaminación con este parásito en productos de consumo crudo. A pesar de que el número de microsporidios requerido para causar enfermedad en humanos se desconoce, se ha comprobado que la inoculación de sólo 100 esporas puede causar enfermedad letal en individuos con deficiencia de linfocitos T (15).

TABLA 2
Prevalencia de Microsporidios, *Cryptosporidium* y *Cyclospora cayetanensis* sp. en hortalizas y frutas de las Ferias del Agricultor del Valle Central durante la estación lluviosa 2001 y seca 2002

Hortaliza/ Fruta	Microsporidios		<i>Cryptosporidium</i> sp.		<i>Cyclospora</i> <i>cayetanensis</i>	
	Seca (n= 25)	Lluviosa (n= 25)	Seca (n= 25)	Lluviosa (n= 25)	Seca (n= 25)	Lluviosa (n= 25)
Lechuga	32 %	32 %	24%	4%	0%	8%
Apio	0 %	0 %	4%	0%	0%	0%
Cilantro	4 %	4 %	4%	0%	0%	0%
Fresas	0 %	4,3 %	0%	0%	0%	0%
Moras	0 %	0%	8%	4%	0%	0%

También, se debe considerar que las esporas de microsporidios son resistentes a condiciones ambientales y pueden permanecer infecciosas por muchos años, particularmente si se encuentran protegidas de la desecación (26), lo cual podría explicar la alta prevalencia en las lechugas las cuales pueden ofrecer un microambiente más húmedo entre sus grandes hojas.

Cryptosporidium sp. también fue aislado en todos los productos excepto en las fresas. La lechuga presentó el mayor porcentaje de positividad (24%) y se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la estación lluviosa (24%) y la seca (4%) ($\alpha < 0,05$).

Los resultados de prevalencia obtenidos para este parásito, muestran una variación importante al compararlos con los que se obtuvieron en un estudio similar realizado hace casi diez años en el país, en los que la prevalencia de criptosporidios encontrada para hojas de cilantro y lechuga fue de 5% y 2,5% respectivamente (14), mientras que los encontrados en este nuevo estudio (Cuadro 2), muestran una disminución de un 3% en las hojas de cilantro, así como un considerable aumento de 11,5% en lechuga. También, dada la baja dosis infectante necesaria para causar infección observada en algunas personas, en los cuales un solo ooquiste es capaz de producir enfermedad (8), debe considerarse importante la prevalencia de 4% encontrada en las moras, y de 2% en apio y cilantro.

Es importante recalcar el papel que el agua ha tenido como fuente de contaminación y transmisión de este parásito, así como considerar el papel que juegan las heces de los animales en las que se puede encontrar este parásito (27). A la vez, debe considerarse la resistencia de este microorganismo al cloro (hipoclorito de sodio), incluso hasta concentraciones de 80 ppm durante 30 min (15).

Cyclospora cayetanensis únicamente fue aislado a partir de la lechuga con una prevalencia del 4% durante la estación seca (Cuadro 2) y sin diferencia significativa entre estaciones

climáticas, lo cual sucede en otros países como Perú (28) y Egipto (29). No obstante, su aislamiento a partir de diversos alimentos frescos ha sido informado a nivel mundial (30-33).

Concluyendo y como análisis general del presente estudio, es importante destacar el alto nivel de contaminación fecal de los productos de consumo crudo seleccionados para esta evaluación, la cual pone de manifiesto que en el país la producción y comercialización de vegetales y frutas se encuentra aún en niveles muy bajos de calidad sanitaria, y que existe un riesgo constante para la población costarricense a pesar de contar con un sistema de salud ubicado entre los mejores de América Latina.

En el caso de los microsporidios, *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora cayetanensis*, donde las técnicas de desinfección y lavado no son lo suficientemente eficientes, se hace imprescindible aplicar las Buenas Prácticas Agrícolas con el fin de garantizar un producto inocuo a la salud humana.

REFERENCIAS

1. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington: AICR. 1997; 436-450.
2. Beuchat L. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J Food Prot. 1996; 59:204-216.
3. Soave R, Herwaldt B & Relman D. *Cyclospora*. Inf Dis Clin North Amer. 1998; 13: 1-11.
4. Huang P, Weber JT & Soisin DM. The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. Ann Intern Med. 1995; 123: 409-411.
5. Hoge CW, Shlim D & Rajah R. Epidemiology of diarrheal illness associated with coccidian-like organism among travelers and foreign residents in Nepal. Lancet. 1993; 341: 1175-1179.
6. Soave R. *Cyclospora*: An overview. Clin Inf Dis. 1996; 23: 429-437.
7. Jelinek T, Lotze M, Eichenlaub S, Loscher T & Northdurff HD. Prevalence of infection with *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* among international travelers. Gut. 1997; 41: 801-804.
8. Steiner T, Thielman N & Guerrant R. Protozoal agents : What are the dangers for the public water supply ? Annu Rev Med. 1997; 48: 329-340.
9. Mackenzie WR, Hoxie NJ & Proctor ME. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N England J Med. 1994; 331: 161-167.
10. Hayes EB, Matte TD & O'Brien TR. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. N Engl J Med. 1989; 320: 1372-1376.
11. Petersen C. *Cryptosporidium* and the food supply. Lancet. 1995; 345: 1128-1129.
12. Bier JW. Isolation of parasites on fruits and vegetables. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1991; 122: 114-145.
13. Ortega Y, Roxas C & Gilman R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected

- in markets of an endemic region in Perú. *Am J Trp Med Hyg.* 1997; 57: 683-686.
14. Monge R, Chinchilla M & Reyes L. Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. *Biol. Trop.* 1996; 44: 369-375.
 15. Didier E. Microsporidiosis. *Clin Inf Dis.* 1998 ; 27 : 1-8.
 16. Fernández M. Calidad sanitaria de aguas utilizadas en la irrigación de hortalizas de la provincia de Cartago-Costa Rica. INCIENSA, San José- Costa Rica. 1993; 60p.
 17. Luna S, Reyes L, Chinchilla M & Catarinella G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en aguas superficiales en Costa Rica. *Parasitol Latinoam.* 2203; 57: 63-63.
 18. Vanderzant C & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: APHA. 1992; 324-345.
 19. Kageruka P, Brand J, Taelman H & Jonas C. Modified Koster staining method for the diagnosis of *Cryptosporidium*. *Am Soc Belge Med Trop.* 1984; 64: 171-175.
 20. Murray P, Baron E & Pfaller M. Manual of clinical microbiology. 6th Ed. Washington, D.C: ASM Press. 1995; 44-46.
 21. Webber P, Brain RT & Owen RL. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Eng J Med.* 1992; 26: 161-166.
 22. Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature.* 2000; 406: 762-767.
 23. Mead PS. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 607-625.
 24. Monge R. Calidad Sanitaria de las hortalizas que se consumen crudas en el Valle Central de Costa Rica. Tesis. 1997; 25-72.
 25. Fernández M. Calidad Sanitaria de aguas utilizadas en la irrigación de hortalizas de la provincia de Cartago, Costa Rica. INCIENSA, San José, Costa Rica. 1993; 60.
 26. García L. Laboratory Identification of the Microsporidia. *Jour Clin Microb.* 2002 ; 40 : 1892-1901.
 27. Howe AD. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a *Cryptosporidiosis* Outbreak. *Emerg Inf Dis.* 2002; 8: 6.
 28. Ortega, R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 57: 683-686.
 29. Abou N. Studies on a newly emerging protozoal pathogen: *Cyclospora cayetanensis*. *J Egypt Soc Parasitol.* 1999; 29: 575-586.
 30. Ho A Y & López AS. Outbreak of *Cyclospora* associated with imported raspberries. *Emerg Inf Dis.* 2002: 8: 783-788.
 31. Chioldini PL. A new parasite : human infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 ; 88: 369-371.
 32. Huang P & Weber T. The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. *Ann Intern Med.* 1995; 123: 409-414.
 33. Rivera N, Torrejon E & Madrid M. Primer hallazgo de *Cyclospora cayetanensis* en Concepción, Chile. *Parasitol al Día.* 1997; 21: 129-132.

Recibido: 14-05-2004

Aceptado: 30-09-2004

Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica

Graciela Morales, Laura Blanco, María Laura Arias y Carolina Chaves

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. El presente trabajo evaluó la flora normal y patógena asociada a la tilapia (*Oreochromis niloticus*), ya que no existen estudios previos, a nivel nacional, sobre la calidad microbiológica de este producto. Con este propósito, se determinó el Recuento Total Aerobio (RT), el número de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF), *Enterococcus* sp., *Aeromonas* sp., bacterias lácticas y la presencia de *Listeria* sp y *Salmonella* spp. a partir de la superficie externa de la tilapia. Se recolectaron 50 muestras provenientes de las zonas de San Carlos y Cañas y se transportaron en frío hasta el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, donde se efectuaron los análisis señalados según la metodología presentada por la American Public Health Association, 1998. Los resultados obtenidos confirman, desde el punto de vista microbiológico, la frescura de las tilapias al momento de su análisis, sin embargo, los niveles de coliformes encontrados fueron inaceptables para el consumo humano. No se logró aislar *Listeria* sp., pero el aislamiento de *Salmonella* spp. confirmó la contaminación fecal de las aguas de crianza de la tilapia, aparte de su importancia a nivel de salud pública. También se encontró que la tilapia presenta un número elevado de *Aeromonas* sp. como parte de su flora normal, por lo que se recomienda incluir este género dentro de las normas de calidad para pescado fresco. Según los datos obtenidos, no existe diferencia significativa (95% de confianza) entre el RT, los niveles de CT y CF, *Enterococcus* sp y *Aeromonas* sp. a partir de la tilapia proveniente de los criaderos de las zonas de San Carlos y Cañas.

Palabras clave: Tilapia, evaluación microbiológica, *Enterococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Listeria* sp., *Salmonella* spp.

INTRODUCCION

La tilapia (*Oreochromis niloticus*), es un pez del grupo de los Teléosteos, orden Peciformes, perteneciente a la familia Ciclidae, sub familia Tilapiinae y género *Oreochromis*. Aunque se conocen más de 100 especies de tilapia, sólo algunas son de importancia a nivel de producción en condiciones controladas de cultivo: tilapia roja, tilapia nilótico, tilapia áurea y tilapia stirling (1).

La tilapia presenta una serie de características biológicas y ecológicas especiales como un rápido crecimiento, resistencia a enfermedades y condiciones adversas, conversión eficiente del

SUMMARY. Bacteriological evaluation of fresh tilapia (*Oreochromis niloticus*) coming from the northern region of Costa Rica. The following work presents an evaluation of the normal and pathogenic flora associated to tilapia (*Oreochromis niloticus*), since there are no previous national studies referred to the microbiological quality of this product. The total aerobic plate count, lactic bacteria, *Enterococcus* sp and *Aeromonas* sp and fecal and total coliform count, and the presence of *Listeria* sp and *Salmonella* spp from the external surface of tilapias were evaluated. A total of 50 samples, coming from San Carlos and Cañas zones were transported in ice to the Food and Water Microbiology Laboratory, Universidad de Costa Rica, where the laboratory analysis were performed, according to the methodology presented by de American Public Health Association, 1998. The results obtained confirm the microbiological freshness of the product when the analysis was performed, although coliform levels were unacceptable. *Listeria* sp was not found, but the isolation of *Salmonella* spp. confirms the fecal contamination of water where the tilapia is grown, aside of the Public Health concern. Also, it was found a high number of *Aeromonas* sp, as part of its normal flora, so we recommend including this genus in the quality standards for fresh fish. According to the data obtained, there was no significant difference (95% confidence) between the total plate count, fecal and total coliforms, *Enterococcus* sp. and *Aeromonas* sp. from the samples coming from the zones of San Carlos and Cañas. **Key words:** Tilapia, microbiological evaluation, *Enterococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Listeria* sp., *Salmonella* spp.

alimento, alta fecundidad, maduración temprana, aceptación de alimentos artificiales, entre otros. Su capacidad de producir una alta descendencia a una edad relativamente temprana, la hace ideal para su "cultivo". La tilapia madura a una edad de dos o tres meses, y en adelante puede tener crías cada tres o seis semanas, si se encuentra en condiciones óptimas (2)

La tilapia, considerada en otro tiempo un pescado de bajo valor, adecuada solamente para mercados étnicos, ha ganado popularidad en años recientes. Actualmente, tiene buena aceptación por el consumidor y es considerada una atractiva opción del menú en cadenas de restaurantes a nivel nacional e internacional.

En los últimos años, el mercado mundial de pescado ha evolucionado, tanto cuantitativa como cualitativamente, y de manera continua. Ejemplo de esto es que en 1961, los 3 mil millones de habitantes del planeta consumían anualmente, un promedio de 8,9 kg de pescado per cápita. En 1998, según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), los 6 mil millones de habitantes del planeta consumían un promedio anual de 15,7 kg de pescado per cápita. En términos generales, la producción y el comercio de pescado se multiplicaron por 4 en los últimos 40 años, debido a la duplicación de la población y al aumento del consumo. En América Latina, la evolución fue similar: los 225 millones de latinoamericanos que consumían un promedio de 5,4 kg/persona de pescado en el año 1961, aumentaron a 490 millones que consumen un promedio de 9,6 kg/persona en 1998 (3).

El panorama global de la acuicultura es el de una industria localizada principalmente en países en vías de desarrollo, enfocada a la producción de pescado de agua dulce (4). En cuanto a la producción de tilapia, Taiwán es el mayor exportador del mundo en términos de volumen. Los mayores proveedores de filetes congelados a los Estados Unidos son Taiwán, Tailandia e Indonesia, mientras que Costa Rica domina el mercado de tilapia fresca a ese país (5).

Desde principio de la década de los setentas, se ha promovido el desarrollo de la acuicultura en Costa Rica (6), siendo casi totalmente dominada por el tipo continental de agua dulce, con énfasis en el cultivo de peces, específicamente trucha y tilapia. El cultivo de esta última se da en las siete provincias del país, no obstante, Guanacaste es la provincia con mayor producción (30 productores con 7215 toneladas/año) y Alajuela, específicamente San Carlos, posee el mayor número de productores (435 con 444 toneladas/año).

La producción de tilapia tiene un gran potencial, ya que el país cuenta con condiciones climáticas, hidrográficas y topográficas favorables para este tipo de actividad, además de su cercanía al mayor mercado de consumo de tilapia (EEUU) (7).

Con respecto a la flora microbiana de la tilapia viva, ésta depende de la flora existente en las aguas de donde proviene (5) y varía de acuerdo con el hábitat de la especie, sobre todo con la temperatura, profundidad, grado de contaminación de las aguas y cercanía de la costa. Se destaca la presencia de psicrófilos Gram negativos incluyendo *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* y *Aeromonadaceae*. Entre los Gram positivos existe una proporción variable de *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* (8). Las bacterias patógenas o indicadoras de contaminación raramente son encontradas en el pescado recién capturado, a no ser que provenga de aguas excesivamente contaminadas con materia fecal (5).

A pesar de la importancia económica de este producto, no existen estudios a nivel nacional sobre la caracterización de la flora normal y patógena asociada a la tilapia. El objetivo del presente trabajo es evaluar la calidad microbiológica de tilapia fresca, analizando la presencia de bacterias indicadoras de contaminación así como patógenas de importancia en Salud Pública.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de muestras

Se recolectó un total de 50 tilapias de aproximadamente 188 ± 32 g cada una, provenientes de los estanques de productores de la zona de San Carlos (n=40) así como de una empresa comercializadora a nivel industrial ubicada en Cañas, Guanacaste (n=10). Estas últimas muestras se utilizaron como referencia con el fin de comparar la calidad microbiológica de las tilapias entre la zonas de San Carlos y Cañas.

Para capturar las tilapias se usó el método habitual del sitio de muestreo, incluyendo el uso de redes, anzuelo, cuerda, coladores, encierro de malla, entre otros. Con el fin de no alterar la flora de piel y escamas, se evitó el contacto de tilapias con cualquier elemento fuera de su ambiente natural. Una vez fuera del estanque, las muestras fueron colocadas en bolsas estériles y depositadas de inmediato en hielera para su transporte. Las muestras fueron mantenidas en frío hasta su análisis en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. El estudio se realizó entre los meses de noviembre 2002 y abril del 2003.

Análisis de laboratorio

A partir de cada muestra se realizó un recuento total aerobio, recuento de bacterias lácticas, de coliformes totales, fecales, *Enterococcus* y *Aeromonas* sp., determinación de la presencia de *Listeria* sp y *Salmonella* spp según la metodología descrita en American Public Health Association (9).

Preparación de muestras

Cada muestra fue pesada en balanza granataria y se le agregó un volumen de agua peptonada estéril (APE) 0,1% igual a su peso. Se realizó un lavado de la superficie de la tilapia durante 1,5 min aproximadamente. El líquido resultante se utilizó para hacer diluciones decimales (10^{-2} a 10^{-8}) también con APE 0,1%.

Recuento total de mesófilos aerobio

De cada dilución preparada, se inoculó por duplicado y mediante esparcimiento, 0,1 mL en placas de agar estándar (Difco®) + TTC (2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolium). Estas placas fueron incubadas a 35°C por 48 horas

Recuento de coliformes

Se realizó a partir de cada dilución preparada, por vaciado, utilizando agar bilis rojo violeta (Difco®), el cual fue incubado a 35°C por 48 h para la determinación de coliformes totales y a 44,5°C por 24 h para la determinación de coliformes fecales.

Recuento de bacterias lácticas

Se realizó por esparcimiento a partir de cada dilución preparada utilizando agar Rogosa (Difco®), el cual fue incubado a temperatura ambiente por 4 días.

Recuento de enterococcus

Se realizó por esparcimiento a partir de cada dilución preparada utilizando agar EVA (ethyl violet agar) (Difco®) el cual fue incubado a 35°C por 48 h.

Detección de género Listeria

A partir de la dilución inicial, se inoculó 10 mL en caldo *Listeria*, el cual fue incubado a 35°C por 24 h como enriquecimiento. El aislamiento selectivo se realizó en agar Oxford (Difco®) el cual fue incubado a 35°C por 48 h. Las colonias sospechosas (halo negro y presencia central) fueron confirmadas por pruebas que incluyen el Gram, moviliad, catalasa, oxidasa, utilización de carbohidratos y CAMP.

Detección de *Salmonella* spp.

Se realizó un enriquecimiento a partir de la dilución inicial por 24 a 35°C. Posteriormente, se realizó un enriquecimiento selectivo utilizando caldo selenito y caldo tetratioato, incubados a 35 y 43°C por 24 h. El aislamiento selectivo fue hecho en agar XLD y agar Hecktoen, los cuales se incubaron a 35°C por 24h. Las cepas sospechosas fueron identificadas utilizando el sistema API 20E® así como pruebas serológicas (antisuero poli A-I + Vi Difco®)

Cuantificación de *Aeromonas* sp.

Se realizó a partir de cada dilución utilizando agar SA (almidón ampicilina) el cual fue incubado a 35°C por 48 h y posteriormente inundado con solución de lugol-yoduro para verificar la hidrólisis del almidón.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Statistix for Windows. En la Tabla 1 se señalan los resultados obtenidos y porcentajes de positividad del análisis de recuento total mesófilo aerobio, coliformes totales, fecales y *Enterococcus* a partir de las muestras de tilapia procedentes de San Carlos y Cañas.

TABLA 1
Distribución porcentual de las muestras de tilapia según el recuento total aerobio, recuento de coliformes totales, fecales y *Enterococcus* sp.

UFC/g	Recuento total mesófilo aerobio n=50	%	Coliformes totales n=50	%	Coliformes fecales n=50	%	Enterococcus sp. n=50	%
<10	0	0	0	0	2	4	0	0
10-10 ²	0	0	3	6	9	18	17	34
10 ² -10 ³	5	10	10	20	13	26	22	44
10 ³ -10 ⁴	13	26	20	40	20	40	10	20
10 ⁴ -10 ⁵	21	42	13	26	6	12	1	2
10 ⁵ -10 ⁷	11	22	4	8	0	0	0	0

Comparando los resultados de recuento total aerobio con los parámetros establecidos por al ICMSF (International Commission for the Microbiological Examination of Foods, 1998) para pescado crudo (10), se encuentra que únicamente 12% de las muestras presentan una aceptación marginal y ninguna sobrepasa el límite de 10⁷ UFC/g, lo cual refleja la frescura del producto en el momento del análisis. Un segundo parámetro contemplado por la ICMSF para pescado crudo establece un límite máximo de 5,0 x 10² UFC/g para coliformes fecales; 58% de las muestras evaluadas presentaron valores superiores y por lo tanto inaceptables.

Los recuentos de coliformes totales son útiles como

indicadores de higiene (11). En este caso, un 74% de las muestras tenían un recuento igual o mayor a 10³ UFC/g, lo cual refleja una higiene deficiente. Esta alta carga de coliformes podría explicarse principalmente por una alta contaminación de las aguas de crianza de tilapia, la cual puede deberse a filtración de aguas negras en los estanques, uso de alimento de baja calidad, entre otros (5).

Los recuentos de enterococos son relativamente altos, un 22% de las muestras poseen un recuento superior a 10³ UFC/g, denotando de nuevo contaminación. La diferencia con los porcentajes obtenidos para coliformes fecales se debe a que estos últimos presentan un tiempo de generación mucho me-

nor que los cocos Gram positivos (9). Por otro lado, se puede destacar la mayor sensibilidad de estos últimos como índice de contaminación fecal, como ha sido reportado en la literatura (9).

En el presente trabajo, se logró aislar una cepa de *Salmonella* sp. a partir de una de las muestras provenientes de la zona de San Carlos. Su presencia confirma, una vez más, la contaminación de las aguas de crianza con materia fecal. Esta bacteria podría llegar al agua a través del alimentos que se le administra a los peces o mediante el "abono orgánico" de los estanques con excremento de animales como la gallinaza (12). El uso de este tipo de abono fue impulsado desde los años setentas en Costa Rica, como una forma de aumentar la productividad del pescado de agua dulce en estanques (6). Actualmente, no se conoce qué tan difundida es esta práctica.

El hallazgo de una cepa de *Salmonella* sp. es de suma importancia desde el punto de vista de Salud Pública y más si se considera la baja sensibilidad del método utilizado, donde se necesita una población mayor a 10^2 UFC/g para obtener un resultado positivo. La baja sensibilidad del método, aún cuando es el estandarizado, se debe a la interferencia por la abundante flora competitiva, el pobre estado fisiológico de la bacteria, y la necesidad de aislarla mediante un medio primario no selectivo (9).

Aeromonas sp fue aislada a partir del 98% de las tilapias evaluadas, donde el 80% presentó recuentos superiores a 10^3 UFC/g. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Hanninen et al en 1997 (13) donde se aisló esta bacteria a partir del 93% de las muestras (n=29) y los de Neyts et al (14), donde se obtuvo un 55% de positividad a partir de muestras de pescado y camarón. A pesar de repetidos aislamientos de esta bacteria, su dosis infectante no está definida, ni hay normas que regulen cuál debe ser el recuento permitido en pescado (14,15).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que *Aeromonas* es capaz de reproducirse y deteriorar peces de agua dulce conservados en hielo y a temperatura ambiente (10,16). Gram & Huss (8) citan a esta bacteria como el agente de descomposición específico del pescado de agua dulce mantenido en atmósfera aerobia y a temperatura ambiente; González et al confirman su papel de agente de deterioro en peces de agua dulce conservados en hielo (17).

Aeromonas sp. también es importante a nivel de Salud Pública. Varias especies presentan la habilidad de producir toxinas a bajas temperaturas asociadas a intoxicaciones alimentarias (15).

Con respecto a *Listeria* sp., no se aislaron cepas a partir de las muestras de tilapia analizadas. Estudios similares realizados a partir de peces han proporcionado datos divergentes, presentándose amplias variaciones en los porcentajes de aislamiento. Karunasagar (2000) refiere que estas diferencias pueden deberse a la metodología utilizada, a diferencias

en el tipo de muestra analizada (pescado fresco y fileteado) y a variaciones debidas a las distintas especies de peces o a la estación del año (18).

A partir de la cuantificación de bacterias lácticas en las muestras analizadas se obtuvo resultados bajos (94% de las muestras presentan recuentos inferiores a 10^3 UFC/g). Estos resultados coinciden con otros estudios en donde las bacterias lácticas están presentes sólo en altas cantidades como flora de descomposición de pescado almacenado al vacío o con atmósfera modificada mediante CO_2 (productos levemente conservados) (8,17).

En cuanto a la comparación de zonas de producción de tilapia, no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en cuanto a todos los parámetros evaluados excepto bacterias lácticas, donde San Carlos presenta recuentos mucho mayores que Cañas. Esta diferencia podría explicarse por variación en el pH del agua, en la temperatura ambiental y en las condiciones climáticas de ambas zonas geográficas.

Nuestro estudio refleja la flora microbiológica superficial que presenta la tilapia en su entorno, incluyendo la presencia de microorganismos de deterioro y patógenos; pero no refleja la flora derivada de la manipulación, ni la carga posterior a su procesamiento, por lo que se recomienda, en un futuro trabajo, valorar estos parámetros y su impacto sobre su exportación y la Salud Pública.

También, dado el elevado número de *Aeromonas* sp. aislado, se recomienda incluir este género dentro de las normas de calidad para pescado fresco.

REFERENCIAS

1. Chacón E. Biología general de la tilapia: curso básico de acuicultura, énfasis en trucha y tilapia. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara, 2002.
2. Pérez H, Castillo J. Perfil metodológico para el cultivo de tilapia en estanques de tierra y jaulas flotantes. Informe de Prodepesca. Convenio Istmo/B7-310/IB ALA/90/09. Unión Europea- OSPESCA, 1998.
3. Ramírez R. Aspectos de mercado nacional e internacional de la tilapia: Curso básico de acuicultura, énfasis en trucha y tilapia. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara : 2002,74-80.
4. Howgate P. Review of the public health safety of products from aquaculture. Int J Food Sci Tech. 1998;33: 99-125.
5. Viquez F, Aiello J, Amerling C. Características biométricas y químicas de la tilapia de agua dulce (*Oreochromis nilotica*) y uso del pH y de las características organolépticas para estimar su vida útil sensorial almacenada a 5°C. Tesis. Universidad de Costa Rica, 2003.
6. Nanne H. La proteína a domicilio. Troquel. 1977;1: 30-31.
7. Otárola A. Producción acuícola en Costa Rica: curso básico de acuicultura, énfasis en trucha y tilapia. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara. 2002;69-73.

8. Gram L & Huss H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol.* 1996;33:121-137.
9. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 1998.
10. ICMSF. Microorganisms in foods: microbiological ecology of food contaminants. Blackie Academic and Professional, London, 1998.
11. Arias ML, Chaves C, Antillón F & Villalobos L. Microbiología de Aguas y Alimentos. Manual de Laboratorio. Lara Segura y Asociados, San José, 2002.
12. Dalsgaard A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. *Int J Food Sci. Tech.* 1998;33: 127-138.
13. Hänninen M, Oivanen P, Hirvelä-Koski V. *Aeromonas* species in fish, fish eggs, shrimp and freshwater. *Int J Food Microbiol.* 1997;34: 17-26.
14. Neyts K, Huys G, Uyttendaele J, Swings J & Debevere J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Letters in Appl. Microbiol.* 2000;31: 359-363.
15. González C, Santos J, García López M, González N & Otero A. Mesophilic *Aeromonads* in wild and aquacultured freshwater fish. *J Food Prot.* 2001;64: 687-691.
16. González Rodríguez M, Santos J, Otero A, García López IM. PCR detection of potentially pathogenic aeromonads in raw and cold smoked freshwater fish. *J Appl Microbiol.* 2002;93: 75-680.
17. González Rodríguez M, Sanz J, Santos J, Otero A, García López M. Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C. *Int J Food Microbiol.* 2002;77: 161-168.
18. Karunasagar I. Listeria in tropical fish and fishery products. *Int J Food Microbiol.* 2000,62: 177-181.

Recibido: 06-02-2004

Aceptado: 06-09-2004

Adaptabilidad de híbridos de maíz dulce a la congelación en mazorcas

Alejandra O. Ramírez Matheus, Norelkys Maribel Martínez, Ligia O. de Bertorelli, Frank De Venanzi

Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Empresa Del Monte Andina

RESUMEN. El propósito de esta investigación fue evaluar la adaptabilidad de tres híbridos de maíz dulce al procesamiento como mazorcas congeladas. A los híbridos de maíz dulce 2038, 2010, 2004 y Bonanza (patrón), se les determinaron características biométricas, químicas y microbiológicas en estado fresco. Una vez congeladas criogénicamente a -95°C x 7min, se les evaluó el rendimiento industrial, así como las características químicas y microbiológicas a los 45 y 90 días de almacenamiento congelado a -18°C . Todos los híbridos en mazorca congelada presentaron en promedio un rendimiento de 54,2%, valor similar al que maneja la industria para este tipo de producto. Igualmente la longitud de la mazorca (21,57cm), número de hileras (15), diámetro de la mazorca (45,54 mm) así como la altura del grano (8,57 mm), cumplieron con los estándares de calidad exigidos industrialmente. Los resultados demostraron que las mazorcas congeladas de los híbridos estudiados, presentaron buena estabilidad química y microbiológica durante el almacenamiento congelado, destacándose el híbrido 2038.

Palabras clave: Zea mays, maíz dulce, congelación, estabilidad, mazorca, procesamiento.

INTRODUCCION

El maíz dulce adecuado para enlatar o congelar debe tener varias características importantes, entre las cuales figuran el espesor del grano, la uniformidad de la planta y la mazorca (tanto en la textura y consistencia del grano como en la forma y tamaño de la mazorca), alta productividad a nivel de campo y un rendimiento satisfactorio en el proceso de fabricación (1). Las ofertas que presenta el mercado en cuanto al producto congelado, son altamente atractivas y los esfuerzos industriales se han dirigido hacia la obtención de un producto de alta calidad, por lo que se ha trabajado mucho en la selección de variedades más idóneas para la congelación, ya que no todos los maíces que son aptos para enlatar lo son para congelar, proceso que es más delicado (2). Esta selección permitiría ampliar el uso industrial de este rubro, además de beneficiar al agricultor al darle la oportunidad de sembrar otros materiales que se adapten agrónomicamente e industrialmente y que puedan sustituir al híbrido Bonanza comúnmente usado. Por ésta

SUMMARY. *Adaptability of sweet corn ears to a frozen process.* The effects of frozen condition on the quality of three sweet corn ears (2038, 2010, 2004) and the pattern (Bonanza), were evaluated. Biometrics characteristics like ear size, ear diameter, row and kernel deep were measured as well as chemical and physical measurement in fresh and frozen states. The corn ears were frozen at -95°C by 7 minutes. The yield and stability of the frozen ears were evaluated at 45 and 90 days of frozen storage (-18°C). The average commercial yield as frozen corn ear for all the hybrids was 54.2%. The industry has a similar value range of 48% to 54%. The ear size average was 21.57 cm, row number was 15, ear diameter 45.54 mm and the kernel corn deep was 8.57 mm. All these measurements were found not different from commercial values found for the industry. All corn samples evaluated showed good stability despite the frozen processing and storage. Hybrid 2038 ranked higher in quality. **Key words:** Zea mays, sweet corn, frozen storage, stability, ear corn processing.

razón, en los últimos años la empresa Del Monte Andina (EDMA), ha venido realizando trabajos de investigación en Venezuela, sobre la adaptación agrónomicamente e industrialmente de híbridos de maíz dulce (su) y súper dulce (sh2) (3- 6). En esta empresa la congelación del maíz dulce se ha venido realizando desde hace 8 años, siendo el Bonanza el híbrido tradicionalmente usado, del cual se procesan alrededor de 1.000 a 7.000 kg de maíz fresco por día, con un consumo anual de aproximadamente 40.189 kg de mazorca congelada, lo que representa un 7,82% del total de los productos congelados por la empresa (*Lozada, 2002). Por todo lo expuesto, en este trabajo se estudió la adaptabilidad de otros híbridos de maíz dulce al procesamiento como mazorcas congeladas, con el fin de evaluar nuevas alternativas que satisfagan las necesidades de la industria así como las del consumidor.

MATERIALES Y METODOS

Los híbridos de maíz dulce identificados como 2038, 2010, 2004 y el Bonanza usado como patrón, fueron suministrados por la EDMA, provenientes de una siembra semi-comercial

* Lozada, R. 2002. Del Monte Andina (comunicación personal).

ubicada en la localidad de San Joaquín, estado Carabobo. La cosecha se realizó entre los 15 y 18 días después de la polinización, es decir a los 70 días después de la siembra.

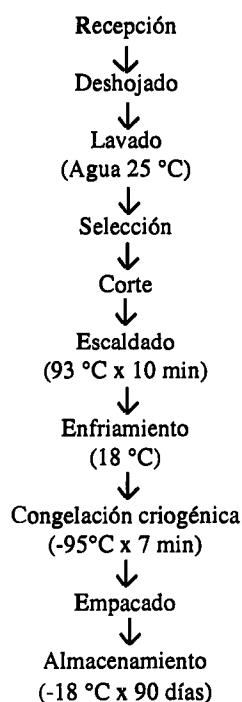
En el ensayo se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con 60 observaciones por tratamiento para la muestra sin procesar, los cuales estuvieron definidos por los cuatro híbridos bajo estudio, y con 6 repeticiones por tratamiento para la muestra congelada.

Congelación del maíz dulce

Las mazorcas de maíz fueron congeladas criogénicamente siguiendo el esquema mostrado en la Figura 1. Las operaciones de recepción, deshojado, lavado, selección, corte, enfriamiento, inspección y empaçado se realizaron de la misma manera que la descrita por Alfonso et al., (6); el escaldado se realizó a 93°C x 10 min, la congelación criogénica se efectuó por convección forzada de nitrógeno líquido en contracorriente en un Aga freeze spleet, a una temperatura de -95°C y un tiempo de retención de 7 min hasta alcanzar una temperatura máxima de -18°C en el centro de las mazorcas, y el almacenamiento se efectuó a una temperatura máxima de -18°C por 45 y 90 días. Para realizar los análisis químicos y microbiológicos, las mazorcas fueron descongeladas, desgranadas manualmente y homogeneizadas en un molino eléctrico.

FIGURA 1

Esquema tecnológico de la congelación de mazorcas de maíz



Determinaciones biométricas

Las determinaciones biométricas (longitud de la mazorca sin hoja, número de hileras, diámetro de la mazorca y altura del grano), se realizaron manualmente utilizando una regla graduada o un vernier digital, según el caso.

Rendimiento industrial

El rendimiento industrial se evaluó de acuerdo a la metodología de la EDMA, sobre la base de la relación de los pesos de 100 mazorcas antes y después de procesar.

Análisis químicos

Los análisis químicos de humedad, pH, acidez titulable, azúcares reductores y totales, se realizaron de acuerdo con la metodología descrita en la AOAC (7), mientras que los sólidos solubles (°Brix), se determinaron según la norma COVENIN N° 924 (8).

Análisis microbiológicos

Se realizaron las siguientes determinaciones según las normas COVENIN: Hongos y levaduras, norma N° 1337 (9); coliformes totales, norma N° 1104-96 (10) y mesófilos y psicrófilos aerobios, norma N° 902 (11).

Análisis estadísticos:

Los resultados se sometieron a un análisis de la varianza, seguido de una prueba de comparación de medias de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinaciones biométricas y rendimiento industrial

Los resultados de las determinaciones biométricas de las mazorcas de maíz dulce (Tabla 1) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los híbridos, presentando el maíz 2038 las mazorcas más largas, con mayor número de hileras, diámetro y altura del grano, no distinguiéndose éstas tres últimas características de las del patrón Bonanza. En relación con la bibliografía consultada, se observó que la longitud de las mazorcas fue mayor al rango (13,34 -18,37cm) señalado para diferentes cultivares de maíz dulce y súper dulce (4,6,12,13), en cambio el número de hileras si coincide con los valores (14 - 16) indicados por varios investigadores (4,6,14). El diámetro de las mazorcas, aunque es superior al encontrado en maíz dulce (36,9-38,3 mm) por Gómez (12), es parecido al obtenido en razas mexicanas (44 - 48 mm) por Wellhausen *et al.*, (14) y en maíces súper dulces (48,5 mm) por Ávila y Bernaez (4), mientras que la altura del grano fue inferior al valor señalado (12,3 mm) por Wellhausen *et al.*, (14).

TABLA 1
Determinaciones biométricas de cuatro híbridos de maíz dulce (su) en estado fresco y rendimiento en mazorcas congeladas

Híbridos	Longitud de la mazorca sin hoja (cm)	N° Hileras de la mazorca	Diámetro de la mazorca (mm)	Altura del grano (mm)	Rendimiento en mazorcas (%)
2038	24,58 a	16 a	48,68 a	9,13 a	54,49
2010	20,59 c	14 b	42,98 b	8,12 b	52,00
2004	19,62 d	14 b	42,83 b	7,78 b	56,00
Bonanza	21,47 b	16 a	47,68 a	9,25 a	48 – 54*

Medias en columnas seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 5%.

*Datos suministrados por la Empresa Del Monte Andina

Las características biométricas, son características externas importantes desde el punto de vista industrial y comercial, debido a que forman parte de las especificaciones de calidad del producto final. Los valores obtenidos en este ensayo cumplen con los estándares de calidad exigidos por la EDMA, la cual establece para la mazorca un tamaño no menor de 15 ± 1 cm, con un diámetro mínimo de 40 mm y 100% llena de granos, para satisfacer los requisitos del empaque y garantizar un producto de buena calidad al consumidor. En cuanto al rendimiento industrial, en la Tabla 1 se observa que el híbrido 2004, presentó el mayor rendimiento como mazorca congelada y los resultados se encuentran dentro del rango (48% a 54%) establecido por la EDMA, en tanto que son menores a los encontrados (62,72% a 67,37%) por Alfonzo *et al.*, (6) para mazorcas de maíz súper dulce en congelación.

Características químicas

En la Tabla 2 se presentan los resultados del contenido de humedad, sólidos solubles (°Brix), pH, acidez, azúcares reductores y totales, tanto para los híbridos en estado fresco como mazorcas congeladas durante 45 y 90 días de almacenamiento a -18°C . En todas las variables químicas estudiadas se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los híbridos. La humedad de las muestras en estado fresco es menor que la del patrón (Bonanza) con excepción del maíz 2038, cuyo contenido fue semejante. Además los valores difieren de los señalados (71,5% – 80,8%) por otros autores (3, 15, 16), quizás esto pueda deberse a las prácticas culturales aplicadas al cultivo, condiciones climáticas y a diferencias varietales. Como consecuencia de la congelación, las mazorcas experimentaron un ascenso en el contenido de humedad a los 45 días de almacenamiento a -18°C , tal vez debido a la absorción de vapor de agua durante el escaldado y en el curso del procesamiento, mientras que entre los 45 y 90 días de almacenamiento, la humedad disminuyó a valores similares a los de la muestra fresca. Al respecto Lafuente (17) plantea que el principal deterioro

físico de un alimento durante el almacenamiento congelado es la deshidratación, la cual es ocasionada por las fluctuaciones en la temperatura, durante dicho período de almacenamiento. Algunos autores (18) señalan que el maíz dulce tiene una humedad óptima para el consumo cuando presentan entre 70-75%, rango de aceptabilidad al cual se aproximan los valores obtenidos para los maíces estudiados.

Los híbridos de maíz dulce del genotipo (*su*), por lo general, presentan valores de sólidos solubles altos, debido al gran contenido de polisacáridos solubles en agua, tales como el fitoglicógeno, que incrementa los °Brix (19). En los maíces estudiados en estado fresco, estos sólidos variaron entre 21,85% y 28,75%, presentando el híbrido patrón el menor valor, estos resultados coinciden con los obtenidos (22,4%) por Zhu *et al.*, (19) y (28,24%) por Correa (3) para maíz dulce, y son mayores a los encontrados en híbridos superdulces (18,40% - 18,63%) por Alfonzo *et al.*, (6), como era de esperarse. En los maíces estudiados, esta variable no presentó una tendencia definida con respecto al tiempo de almacenamiento congelado, lo cual también ha sido observado por otros autores en el almacenamiento refrigerado de maíz dulce (19) y súper dulce (4). Aunque en el caso de los híbridos superdulces congelados, la tendencia de estos sólidos ha sido disminuir (6).

El pH de los híbridos bajo estudio, fue mayor que el de Bonanza, y concuerda con los valores señalados por varios investigadores (4,6) para híbridos de maíz superdulce (6,42 - 6,59), pero es inferior al hallado por Correa (3) en el maíz dulce Bonanza (7,18). A los 45 días de almacenamiento congelado, el pH de las mazorcas de los híbridos disminuyó, excepto en el híbrido 2038 en el que se observó un aumento. Así mismo, descendió en las mazorcas de los híbridos 2038 y 2010 a los 90 días de congelación, pero aumentó en el híbrido Bonanza y se mantuvo constante en el 2004, es decir presentó un comportamiento no definido; sin embargo al comparar el pH de las mazorcas de los híbridos en estado fresco con el de las mazorcas después de 90 días de almacenamiento

congelado, pareciera que la tendencia de esta variable es a disminuir con el almacenamiento. La acidez de las mazorcas de los híbridos estudiados fue menor a los valores (0,23%-1,14%) señalados en la bibliografía (4,6) para híbridos de maíz superdulce y para el maíz dulce Bonanza (0,23%) (3). Durante el almacenamiento de las mazorcas, la acidez aumentó a los 45 días en los híbridos 2038 y Bonanza, disminuyó en el 2010

y no varió en el 2004, en tanto que a los 90 días aumentó en todos los maíces. Al comparar la acidez de las mazorcas de los híbridos en estado fresco con la de las mazorcas después de 90 días de almacenamiento congelado, se observa que la tendencia de esta variable es aumentar con el almacenamiento, lo cual concuerda con la disminución observada del pH.

TABLA 2
Características químicas de mazorcas de híbridos de maíz dulce congeladas y almacenadas a -18 °C durante 90 días.

Híbridos	Días	Humedad (%)	Sólidos solubles (°Brix)	pH	Acidez (%)	Azúcares reductores (%)	Azúcares totales (%)
2038	Mf	69,8 aA	26,92 bB	6,61 bB	0,12 cC	15,13 bA	19,46 bA
	45	70,14 bA	29,38 bA	6,76 aA	0,25 aB	4,95 aB	13,91 aB
	90	69,11 aA	24,16 bC	6,29 bC	0,45 bA	4,00 aB	8,71 aC
2010	Mf	60,41 cB	28,75 aB	6,38 cA	0,16 aB	6,58 dA	12,69 cA
	45	65,68 cA	32,26 aA	6,00 cB	0,12 bC	1,91 dB	4,48 cB
	90	60,84 cB	33,08 aA	5,44 dC	0,19 cA	1,47 cC	3,11 dC
2004	Mf	62,63 bB	27,85 abB	6,41 cA	0,16 aB	13,84 cA	18,47 bA
	45	64,88 cA	25,12 cC	5,92 cB	0,15 bB	3,45 cB	5,68 cB
	90	63,23 bB	32,16 aA	6,11 cAB	0,21 cA	1,75 cC	4,01 cC
Bonanza	Mf	70,48 aB	21,85 cB	6,66 aA	0,14 bC	17,03 aA	33,77 aA
	45	73,67 aA	26,05 cA	6,34 bC	0,23 aB	3,51 bB	9,48 bB
	90	69,43 aB	22,83 bB	6,58 aB	0,50 aA	3,31 bB	6,48 bC

Mf = Muestra fresca.

Valores en columnas con letras minúsculas comunes no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los híbridos para un mismo tiempo de almacenamiento.

Valores en columnas con letras mayúsculas comunes no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) para un mismo híbrido durante el almacenamiento congelado.

Los contenidos de azúcares reductores y totales de las mazorcas en estado fresco, fueron menores a los del patrón (Bonanza); apreciándose en todos los híbridos *su*, bajo estudio, incluyendo al Bonanza, un contenido mayor de azúcares reductores, pero una menor cantidad de azúcares totales en comparación a los híbridos de maíz superdulces (*sh2*), analizados por Alfonso *et al* (6), esto último era de esperarse, debido a que el gen *su* produce un aumento de los polisacáridos solubles en agua, como el fitoglicógeno y disminuye la síntesis del almidón, mientras que el gen *sh2* no sintetiza la enzima ADP-glucosafosforilasa, clave en la síntesis del almidón, causando una acumulación de sacarosa y de lípidos en lugar de polisacáridos solubles y almidón, en consecuencia los híbridos *sh2* poseen cuatro u ocho veces más azúcares que los

híbridos *su* (20). En general, la reducción de los azúcares en los maíces congelados evidencia pérdidas de estos compuestos, posiblemente en el proceso de escaldado y durante el almacenamiento al reaccionar con aminas, aminoácidos y proteínas produciendo acetil-carbonil-amina (21).

Análisis microbiológicos

En la Tabla 3, la cual muestra la calidad microbiológica de los híbridos de maíz, se observan altas poblaciones de los microorganismos estudiados en las muestras frescas, excepto en el híbrido 2004, el cual presentó bajas poblaciones de hongos y levaduras. En los psicrófilos, los valores son bajos si se comparan con los de Alfonso *et al.*, (6) para híbridos de maíz superdulce ($5,3 \times 10^2$ - $3,5 \times 10^5$).

TABLA 3
Calidad microbiológica de mazorcas de híbridos de maíz dulce congeladas y almacenadas a -18 °C durante 90 días

Híbrido	Días	Hongos Propágulos/g	Levaduras Ufc/g	Mesófilos aerobios Ufc/g	Coliformes totales Ufc/g	Psicrófilos Ufc/g
2038	0	6×10^3	$5,1 \times 10^4$	$1,85 \times 10^6$	$0,21 \times 10^3$	<300
	45	$3,2 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$	$6,18 \times 10^3$	$0,48 \times 10^2$	< 300
	90	10×10^1	$9,7 \times 10^2$	$3,5 \times 10^3$	<30	< 300
2010	0	$8,4 \times 10^3$	$4,5 \times 10^4$	$0,17 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$	<300
	45	$4,6 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$3,93 \times 10^3$	$2,41 \times 10^2$	< 300
	90	21×10^1	$1,9 \times 10^2$	< 30	$1,15 \times 10^2$	< 300
2004	0	<30	<30	$5,3 \times 10^6$	>2400	<300
	45	< 30	< 30	$8,95 \times 10^3$	$5,8 \times 10^2$	< 300
	90	< 30	< 30	$4,59 \times 10^3$	$0,93 \times 10^2$	< 300
Bonanza	0	49×10^3	$3,5 \times 10^4$	$1,42 \times 10^6$	$0,93 \times 10^3$	< 300
	45	$2,82 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	$4,1 \times 10^3$	$1,92 \times 10^2$	< 300
	90	$5,5 \times 10^1$	$2,9 \times 10^2$	$2,38 \times 10^3$	$0,88 \times 10^2$	< 300

Evaluar la calidad microbiana de la materia prima es de suma importancia, ya que influye marcadamente en la estabilidad e inocuidad del producto final; algunos autores (22) recomiendan que el maíz dulce, antes de entrar en los congeladores, no deben de contener más de 60.000 bacterias/g, lo cual coincide con los resultados obtenidos. En las mazorcas congeladas y almacenadas durante 45 días y 90 días a -18 °C, se aprecia que la carga microbiana disminuyó drásticamente luego del proceso de escaldado y congelación, y prosiguió durante el almacenamiento congelado a -18 °C, caso contrario al ocurrido en maíces súper dulces (6). Las bacterias se ubicaron por debajo del estándar establecido por la EDMA (23), para este producto, la cual fija un valor menor de 100×10^3 g en carga microbiana de bacterias o contaje total en placas. Finalmente se puede decir que las mazorcas se encontraban dentro del rango microbiológico aceptable, siendo un indicador de la calidad de los maíces congelados.

En conclusión las mazorcas de los híbridos de maíz dulce 2038, 2010, 2004 y Bonanza, cumplieron con las especificaciones establecidas por la EDMA, tanto en las características biométricas como en el rendimiento obtenido en mazorcas congeladas, por lo cual satisfacen la expectativa de uso a nivel industrial. Al comparar los híbridos en estado fresco con el patrón, se aprecia que estos presentaron un pH más bajo, menor contenido de humedad, azúcares reductores y totales, y mayor porcentaje de sólidos solubles y acidez, con excepción del híbrido 2038 cuya contenido de humedad no se diferenció de la del patrón. Con relación a las características químicas de las mazorcas congeladas, todos los híbridos

mostraron una buena estabilidad, presentando ligeras disminuciones en la humedad, °Brix, pH, y acidez, con excepción de los azúcares reductores y totales que se redujeron notoriamente. La calidad microbiológica de las mazorcas congeladas de los híbridos de maíz dulce también se ajustó a los parámetros establecidos por la EDMA para este tipo de producto, por lo que los híbridos estudiados pueden ser considerados aptos para su procesamiento y consumo, destacándose el híbrido 2083, cuyas características fueron parecidas al Bonanza.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su reconocimiento a la empresa Del Monte Andina, por la colaboración prestada en el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Jugenheimer, R. Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Editorial Limusa. México, 1990. 834 p.
- Zbigniew, G y Postolski, J. Tecnología de la congelación de los alimentos. Editorial Acribia, Madrid, 1985. 631 p.
- Correa, D. Determinación del punto óptimo de cosecha del maíz dulce (*Zea mays* L.) "Bonanza" para su enlatado. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, 1999. 100 p.
- Ávila, M y Bernaez, J. Efecto del gen brittle-1 (bt1) sobre las características de la calidad de las mazorcas en híbridos de

- maíz super dulce (*Zea mays* L.) tropicales. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, 2000. 101 p.
5. Camacho C, Alfonzo B, Ortiz de B L y De Venanzi F. Estudio de la estabilidad de las características químicas, microbiológicas y sensoriales de mazorcas refrigeradas de híbridos de maíz súper dulce. Arch. Latinoamer. Nutr. 2001; 51 (2): 180-186.
 6. Alfonzo B, Camacho C, Ortiz de B L y De Venanzi F. Adaptabilidad de mazorcas de híbridos de maíz súper dulce al procesamiento industrial. I congelación. Arch. Latinoamer. Nutr. 2002; 52 (3): 294-300.
 7. Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.). Official Methods of Analysis. 15th Ed. Washington D.C., 1990. 1298 p.
 8. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma venezolana N° 924-88. Determinación de sólidos solubles en frutas y productos derivados. Ministerio de Fomento. Caracas-Venezuela, 1978. 21p.
 9. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma venezolana N° 1337-78. Determinación de hongos y levaduras. Ministerio de Fomento. Caracas-Venezuela, 1978. 6p.
 10. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma venezolana N° 1104-84. Determinación del número más probable de coliformes fecales y de *Escherichia coli*. Ministerio de Fomento. Caracas- Venezuela, 1984. 12p.
 11. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma venezolana N° 902-87. Métodos para el recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de petri. Ministerio de Fomento. Caracas- Venezuela, 1987. 3p.
 12. Gómez, E. Evaluación de tres cultivares y cuatro densidades de-siembra en maíz dulce (*Zea mays* L.). Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, 1995. 72 p.
 13. Fondo Hondureño de Investigación Agrícola (FHIA) "Citing the sites" (on line): Maíz dulce. <http://fhia.hn/maiz-dulce.htm>. (14 de Enero del 2001).
 14. Wellhausen J; Roberts L y Hernández E. Razas de maíz en México su origen, características y distribución. Programa de agricultura cooperativo de la secretaria y ganadería de México. Fundación Rockefeller, 1984. 236 p.
 15. Evensen KB y Boyer CD. Carbohydrate composition and sensory quality of fresh and stored sweet corn. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1986; 111 (5): 734-768.
 16. Wong AD; Juvik JA; Breeden DC y Swiader JM. Shrunken 2 sweet corn yield and the chemical components of quality. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1994; 119 (4):747-755.
 17. Lafuente B. La calidad de los alimentos congelados. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 1982; 22 (1): 39-50.
 18. Wann EV, Brown G y Hills WA. Genetic modifications of sweet corn quality. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1971; 96:441-444.
 19. Zhu S, Mount JR y Collins JL. Sugar and soluble solids changes in refrigerated sweet corn (*Zea Mays* L.). J. Food Sci. 1992; 57 (2): 454-457.
 20. Creech RG. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. Genetics 1965; 52:1175-1186.
 21. Salunke DK. Storage, processing and nutritional quality of fruits and vegetables. Cleveland, Ohio, Ed. CRC Inc.1974. 166 p.
 22. Frazier WC y Westthof DC. Microbiología Básica de los Alimentos. 4ª ed. Zaragoza, España. Ed. Acribia.1993. 681 p.
 23. Empresa Del Monte Andina (EDMA). Compañía Venezolana de Conservas C.A. Manual de procesos para elaborar maíz dulce en mazorcas y desgranado congelado, 2000. 49 p.

Recibido: 28-01-2004

Aceptado: 13-12-2004

DetECCIÓN DE PLAGUICIDAS EN VEGETALES DE COSTA RICA MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE COLINESTERASAS HUMANAS

Karl Schosinsky Nevermann y Eugenia Quintana Guzmán

Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET) y Departamento de Análisis Clínicos,
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. Mediante un método sencillo y de bajo costo basado en la inhibición de la actividad de las colinesterasas sérica y eritrocítica, se detectó la presencia de plaguicidas organofosforados y/o carbamatos en lechuga (*Lactuca sativa*), culantro (*Coriandrum santivum*) y apio (*Apium graveolens*) obtenidos de las Ferias del Agricultor del Valle Central de Costa Rica. El porcentaje de inhibición de las colinesterasas se relaciona con la cantidad de plaguicida presente en el vegetal. El 13% del total de muestras analizadas resultaron ser positivas por estos plaguicidas al utilizar colinesterasa sérica como indicador y el 33% al utilizar colinesterasa eritrocítica. El lavado y el cocinado de los vegetales para ambas colinesterasas no causan mayor efecto en la eliminación del plaguicida pero tiende a disminuir ligeramente la concentración del mismo. Se encontró evidencia estadística altamente significativa ($p = 0,0001$) indicando que la colinesterasa eritrocítica presenta mayor sensibilidad analítica con respecto a la sérica. Es de suma importancia determinar la presencia de plaguicidas en los productos agrícolas que consumimos, pues éstos están expuestos a contaminación por fumigación directa, contaminación de los suelos y aguas de riego, y por lo general son productos que se consumen sin un lavado adecuado y sin cocción.

Palabras clave: Colinesterasa sérica, colinesterasa eritrocítica, organofosforados, carbamatos, plaguicidas, vegetales, hortalizas.

SUMMARY. Pesticide detection in Costarican vegetables based on the inhibition of serum and erythrocytic human cholinesterases. A simple and low cost method able to detect the presence of pesticides, organophosphates and carbamates based on the inhibition of serum and erythrocytic cholinesterases, was used in lettuce (*Lactuca sativa*), cilantro (*Coriandrum santivum*) and celery (*Apium graveolens*) obtained from the Ferias del Agricultor from Valle Central of Costa Rica. The percentage inhibition of cholinesterases is related to the presence of plaguicide in the vegetable. Thirteen percent of the analyzed samples were positive for plaguicides using serum cholinesterase and 33% for erythrocytic cholinesterase. Washing and cooking the vegetables does not eliminate the presence of plaguicides but they lower slightly the concentration. Statistical evidence ($p = 0,0001$) indicates that erythrocytic cholinesterase has higher analytical sensitivity than serum cholinesterase. It is very important to establish the degree of contamination with pesticides in these agricultural products because they are exposed to direct contamination by fumigation, soil contamination and irrigation water, and are products that are often consumed without adequate cooking and washing.

Key words: Serum cholinesterase, erythrocytic cholinesterase, organophosphates, carbamates, pesticides, vegetables, hortalsices.

INTRODUCCION

Los plaguicidas son sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Esto incluye a los vectores de enfermedades humanas o animales y a las especies no deseadas de plantas o animales que pueden causar perjuicio o interferir en la producción, elaboración, transporte o comercialización de alimentos (1-3).

Los plaguicidas son utilizados tanto en actividades agrícolas como pecuarias y de salud pública por la que se fabrican aproximadamente 1.5 millones de toneladas al año (4).

Se estima que actualmente el 85% de los plaguicidas empleados en el mundo se dedican al sector agropecuario (5-8). Los plaguicidas han dado un gran aporte a la agricultura y junto a los fertilizantes son los que más han contribuido en el incremento del rendimiento agropecuario (9). Costa Rica es el país centroamericano que más agroquímicos utiliza y se calcula que casi duplica la cantidad per cápita de producto consumido con el resto de la región (10).

El uso indiscriminado de estas sustancias está ocasionando contaminación de aguas, suelo y alimentos, teniendo una incidencia negativa sobre la vida silvestre y el hombre (11). La presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos que se derivan de su uso durante las diversas fases de la producción, almacenamiento, elaboración, preparación y comercialización ha despertado gran interés por sus repercusiones en la salud y como un factor preponderante que interviene en las relaciones comerciales internacionales.

Financiamiento: Vicerrectoría de Investigación y Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Los plaguicidas organofosforados y algunos carbamatos son inhibidores de la colinesterasa, enzima humana que cataliza la hidrólisis de ésteres del neurotransmisor colina, por lo que la determinación de la actividad de esta enzima es un indicador de la exposición a estos compuestos (12). Hay dos tipos de colinesterasas, la sérica y la eritrocítica. La actividad de la enzima sérica disminuye más rápido que la eritrocítica, por lo que la determinación de la actividad sérica es un índice muy sensible para prevenir intoxicación. La determinación de la actividad de la enzima eritrocítica es de importancia en los sistemas de vigilancia para intoxicaciones crónicas ya que permanece disminuida por más tiempo que la sérica (13).

La intoxicación por plaguicidas organofosforados y carbamatos produce efectos residuales, sobre todo en el Sistema Nervioso Central y en el Periférico, así como en las funciones neuromusculares (14-16). Se ha documentado que ciertos plaguicidas están asociados con el desarrollo de cáncer, esterilidad y malformaciones congénitas y se presentan con frecuencia intoxicaciones moderadas y severas. El contacto con el plaguicida se da por aplicación directa, arrastre por el viento, por el agua o por tomarlo del suelo contaminado o de otras fuentes del ambiente (17).

El uso masivo de plaguicidas para proteger la agricultura requiere de la utilización de herramientas adecuadas para la detección de sus residuos en los alimentos y en el agua para garantizar una protección ambiental y dar seguridad al consumidor de estos productos agrícolas (18). Es de suma importancia determinar el grado de contaminación por plaguicidas de los productos agrícolas que consumimos, pues estos están expuestos a contaminación por fumigación directa, contaminación de los suelos y aguas de riego, y por lo general son productos que se consumen sin un lavado adecuado y sin cocción.

En un estudio piloto realizado por Concepción (19) en productos agrícolas de la Feria del Agricultor de Costa Rica mediante pruebas in vitro de inhibición de las colinesterasas, se encontró inhibición considerable en la colinesterasa sérica en cebolla, lechuga, apio, culantro y perejil y de colinesterasa eritrocítica en chile dulce, fresas, tomate, culantro, perejil y repollo. Basados en este principio determinamos la presencia de organofosforados y carbamatos en lechuga, apio y culantro de las Ferias del Agricultor del Valle Central de nuestro país.

El fundamento para la determinación de la actividad enzimática de las colinesterasas se basa en la siguiente reacción (20):

Sustrato + colinesterasa \rightleftharpoons tiocolina + sal del ácido

Tiocolina + DTNB \rightleftharpoons TNB + disulfuro mixto

La formación de TNB es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Sustrato: propioniltiocolina para colinesterasa sérica y acetiltiocolina para colinesterasa eritrocítica.

DTNB: ditionitrobenzoato (incoloro)

TNB: tionitrobenzoato (amarillo)

La exposición a bajos niveles de plaguicidas durante periodos prolongados puede producir en humanos efectos nocivos tales como daños en el sistema nervioso central, malformaciones congénitas, efectos mutagénicos y cáncer, daños en la piel, pulmones, ojos, sistema inmunológico y esterilidad en el hombre (21). Siendo que los organofosforados y carbamatos son los plaguicidas de mayor uso en el agro costarricense (22) y a que el método a utilizar detecta estos químicos, consideramos de suma importancia determinar el grado de contaminación por plaguicidas de los productos que consumimos mediante la utilización de una prueba de inhibición enzimática que presenta la ventaja sobre los métodos tradicionales (cromatografía líquida) en que es sencilla, de mucho menor costo y requiere de menor tiempo de análisis.

METODOS

Muestras: Se obtuvieron 50 muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), 50 de culantro (*Coriandum santivum*) y 50 de apio (*Apium graveolens*) en las Ferias del Agricultor de Desamparados, Tres Ríos, Alajuela, Escazú y Guadalupe, correspondiendo a la estación lluviosa de julio a octubre y al verano de febrero a abril para un total de 150 muestras. Las Ferias del Agricultor fueron seleccionadas con una probabilidad proporcional a su tamaño, entre aquellas que se realizan en el Valle Central. Se escogieron las de tamaño mediano a las cuales llegan entre 100 y 200 vendedores. Se recogieron 5 muestras de cada vegetal en diferentes puestos de venta dentro de la misma feria. Cada producto agrícola se empacó individualmente en bolsa plástica y como muestras control se utilizaron los mismos productos agrícolas pero de origen orgánico.

Extractos: Se pesaron 20 g de cada muestra sin lavado previo, se procesaron en un extractor de jugos convencional. Posteriormente se analizó "in vitro" el grado de inhibición de las colinesterasas sérica y eritrocítica de acuerdo a la metodología establecida por Concepción (19) con ligeras modificaciones, como utilizar la mitad del volumen de extracto vegetal y suero o eritrocitos y duplicar el tiempo de incubación de 30 minutos a 60 minutos. Los productos agrícolas sin lavado que dieron un porcentaje de inhibición enzimática superior al 15% se consideraron positivas por plaguicidas y fueron nuevamente analizados previo lavado con agua del tubo

y también previa cocción del mismo en baño de agua en ebullición por 10 minutos.

Métodología: se utilizó como fuente de colinesterasa sérica una mezcla de sueros humanos a los que se les determinó su actividad por un método cinético comercial (Biotec Internacional S.A., San José, Costa Rica), preparándose alícuotas de 2,0 ml y se mantuvieron a -10°C. Como fuente de colinesterasa eritrocítica se utilizó eritrocitos lavados con solución salina isotónica por triplicado y resuspendidos con la misma solución a un volumen de glóbulos rojos al 50% y se almacenaron -10 °C en alícuotas de 1 ml.

Colinesterasa sérica: se mezclaron 100 µl de suero con 100 µl del extracto del producto agrícola y se incubaron 1 hora a 37°C. Se colocó 20µl de esta mezcla en 2,0 ml de reactivo de color y 100 µl de sustrato, se homogenizó y se determinó el A/min. a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160. Para calcular el porcentaje de inhibición enzimática se analizó un control utilizando un extracto libre de plaguicidas (cultivo orgánico) de cada vegetal analizado, cuya actividad enzimática corresponde al 100% de actividad.

Colinesterasa eritrocítica: se mezclaron 100 µl de eritrocitos con 100µl del extracto del producto agrícola y se incubaron 1 hora a 37°C. Se colocaron 10 µl de esta mezcla en 2,0 ml de reactivo de color, se homogenizó e incubó por 10 min a 30°C. Se agregaron 100 µl de sustrato, se homogenizó y se determinó el ΔA/min. a una longitud de onda de 460 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160. Se aplicó el mismo procedimiento para el análisis de las muestras control.

Cálculos:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\Delta A/\text{min. muestra}}{\Delta A/\text{min. control}} (100) - 100$$

Análisis estadístico: para el análisis estadístico se emplearon pruebas de Chi-cuadrado para proporciones con tablas de contingencia dada la naturaleza de los datos, se determinó si dos variables están relacionadas o son independientes entre sí con un 95% de confianza. Se utilizó el programa estadístico JMP de SAS.

RESULTADOS

Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados obtenidos con ambas colinesterasas según porcentaje de inhibición para las muestras sin lavar, lavadas y cocinadas de los vegetales analizados.

TABLA 1
Muestras positivas por colinesterasa sérica en vegetales

% de inhibición	Sin lavar			Lavada			Cocinada		
	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro
16-25	0	1	0	2	1	0	2	3	1
26-35	3	4	0	2	1	1	1	2	1
36-45	1	1	2	1	0	1	0	1	0
> 46	4	2	2	1	2	1	4	1	1
Total	8	8	4	6	4	3	7	7	3

Total de muestras sin lavar: 150 Total de muestras lavadas: 20
Total de muestras cocinadas: 20

TABLA 2
Muestras positivas por colinesterasa eritrocítica en vegetales

% de inhibición	Sin lavar			Lavada			Cocinada		
	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro	Lechuga	Apio	Culantro
16-25	2	6	9	2	2	9	2	2	9
26-35	2	1	7	3	1	4	3	4	2
36-45	5	1	5	4	0	4	3	3	4
> 46	3	5	3	0	4	2	3	3	2
Total	12	13	24	9	7	19	11	12	17

Total de muestras sin lavar: 150 Total de muestras lavadas: 49
Total de muestras cocinadas: 49

En la Tabla 3 se comparan las muestras positivas para ambas colinesterasas, sin lavar y lavadas y en la Tabla 4 sin lavar y cocinadas. El análisis estadístico evidencia que no hay diferencias significativas ($p = 0,822$) entre las muestras positivas sin lavar y lavadas ni tampoco entre las positivas sin lavar y cocinadas ($p = 0,918$).

TABLA 3
Total de muestras positivas sin lavar y lavadas por colinesterasa sérica y eritrocítica

Colinesterasa	Sin lavar	Lavadas
Sérica	20	13
Eritrocítica	49	35
Total	69*	48*

Total de muestras para cada colinesterasa: 150. * $p = 0,822$

TABLA 4
Total de muestras positivas sin lavar y cocinadas
por colinesterasa sérica y eritrocítica

Colinesterasa	Sin lavar	Cocinadas
Sérica	20	17
Eritrocítica	49	40
Total	69*	57*

Total de muestras para cada colinesterasa: 150.

*p = 0,918

La Tabla 5 muestra los resultados de ambas colinesterasas según el vegetal analizado (lechuga, apio y culantro), donde se observa diferencia significativa en la proporción de muestras positivas ($p = 0,01789$) en la colinesterasa eritrocítica sin que se obtenga con la colinesterasa sérica ($p = 0,3973$).

TABLA 5
Total de muestras positivas por colinesterasa sérica
y eritrocítica según el vegetal

Colinesterasa	Lechuga	Apio	Culantro
Sérica*	8	8	4
Eritrocítica†	12	13	24
Total	20	21	28

Total de muestras para cada colinesterasa: 150.

*p = 0,3973

†p = 0,01789

En la Tabla 6 se anota el número de muestras positivas según el vegetal y el origen de la enzima utilizada, donde hay evidencia estadística ($p < 0,0001$) para considerar que la proporción de muestras positivas es diferente para las dos colinesterasas.

TABLA 6
Total de muestras positivas por colinesterasa sérica
y eritrocítica

Vegetal	Sérica		Eritrocítica	
	Nº	%	Nº	%
Lechuga	8	5	12	8
Apio	8	5	13	9
Culantro	4	3	24	16
Total	20*	13	49*	33

Total de muestras para cada colinesterasa: 150 (cincuenta de cada vegetal).

*p < 0.0001

DISCUSION

Se analiza mediante los datos de la Tabla 1 que 20 (13%) de 150 muestras dieron positivas por plaguicidas al utilizar colinesterasa sérica como marcador. De éstas 19 (12,5%) presentaron porcentajes de inhibición superiores al 25%, lo que consideramos que indica contaminación importante. La Tabla 2 muestra que 49 (33%) de 150 muestras analizadas con colinesterasa eritrocítica resultaron ser positivas, de las cuales el 32 (21%) mostró porcentajes de inhibición superiores al 25% indicando también un alto grado de contaminación por plaguicidas.

Es importante destacar que si bien el lavado convencional con agua potable y el cocinado de los vegetales en agua a ebullición por 10 minutos, tanto para la colinesterasa sérica como para la eritrocítica, no causa mayor efecto en la eliminación del plaguicida, si tiende a disminuir la cantidad del mismo ya que los porcentajes de inhibición disminuyen.

En la Tabla 3 se comparan las muestras positivas sin lavar con la muestras positivas lavadas evidenciando que no hay diferencia significativa ($p = 0,822$) entre las muestras positivas tanto para la colinesterasa sérica como para la eritrocítica. Es decir que el lavado de estos vegetales no elimina la presencia del plaguicida.

En la Tabla 4 también se observa que no hay diferencia significativa ($p = 0,918$) entre las muestras positivas sin lavar y las cocinadas al utilizar como marcadores ambas colinesterasas. Esto demuestra que la cocción tampoco elimina la presencia del agente tóxico en los vegetales.

Con respecto a los tres vegetales utilizados (lechuga, apio y culantro) se observa diferencia significativa en la proporción de muestras positivas ($p = 0,01789$) cuando se utiliza colinesterasa eritrocítica. Es decir que la cantidad de muestras positivas varía según el tipo de vegetal, dando mayor número de positivos el culantro con un 48% del total de los culantros analizados, mientras que para lechuga y apio un 25% mostraron positividad. Por otro lado no hay diferencia en la cantidad de muestras positivas cuando se utiliza la colinesterasa sérica ($p = 0,3973$) y el tipo de vegetal utilizado. Sin embargo, el 16% del total de lechugas y apios analizados mostraron positividad al igual que un 82% del total de culantros (Tabla 5). Se observa con estos resultados un mayor porcentaje de positividad al utilizar colinesterasa eritrocítica.

El Tabla 6 muestra evidencia estadística altamente significativa ($p = 0,0001$) indicando que la proporción de muestras con un porcentaje de inhibición positivo es diferente entre ambas colinesterasas, presentando mayor sensibilidad la eritrocítica. Esto se debe probablemente a que la colinesterasa sérica requiere mayor tiempo de incubación con el plaguicida presente en el vegetal para que aumente la sensibilidad del método.

Con respecto a la estación del año se observa diferencia significativa ($p = 0,0039$) para la colinesterasa sérica, indicando que el número de muestras positivas en invierno es menor que en verano. De lo contrario, con la colinesterasa eritrocítica no hay diferencia significativa ($p = 0,384$) entre las dos estaciones del año.

Se concluye que este método basado en la inhibición de las colinesterasas es altamente prometedor para determinar mediante estudios de escrutinio la presencia de organofosforados o carbamatos en vegetales. Tiene la ventaja sobre los métodos convencionales (cromatografía líquida de alta resolución e inmunoenzimáticos) su bajo costo y rapidez de análisis sin que se requiera de equipo sofisticado de alto costo y poca versatilidad. Sin embargo este método no identifica ni cuantifica el tipo de pesticida pero sí permite establecer el grado de toxicidad que puede producir al ser humano, ya que utiliza colinesterasas humanas como indicadores. Este estudio piloto es el primero que se realiza en Costa Rica y probablemente en Latinoamérica utilizando la inhibición enzimática, consideramos que la metodología debe optimizarse para lograr sensibilidad y exactitud óptimas.

REFERENCIAS

1. FAO. International Code of Conduct on the Distribution and use of Pesticides. Rome: Food Agriculture Organization of the United Nations; 1986.
2. International Programme of Chemical Safety (IPCS). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. 1990-1991. Geneva: WHO/IPCS/91
3. Anonymous. Questions and answers about pesticides. Grounds Maintenance 2002; (37): 1-10.2
4. Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R. Pesticide poisoning in the developing world-a minimum pesticide list. The Lancet 2002 Oct 12; 360(9340):1163-1167.
5. Edwards C.A. Agrochemicals as Environmental Pollutants. En: VanHofsten B and Ekstrom G. editores. Control of Pesticide Applications and Residues in Food. A guide and directory 1986. Yppsala, Suecia: Science Press; 1986. p. 1-9.
6. World Bank. World Development Report. New York, USA: Worl Bank; 1982.
7. Food and Agriculture Organization. Agriculture: toward 2000. Roma, Italia: FAO; 1981.
8. Situación epidemiológica de las intoxicaciones agudas por plaguicidas en Centroamérica, 1992-2000. Boletín Epidemiológico OPS 2002; 23(3): 5-9.
9. Barquero M, Constenla M. Determinación de plaguicidas organoclorados en tejido adiposo en Costa Rica. Biol Trop 1986; 34(1): 7-12.
10. Mora S. Plaguicidas. Balance de un problema. Aportes 1997;115: 18-21.
11. Carazo E, Fuentes G, Constenla M. Residuos de insecticidas organofosforados en repollo. Turrialba 1976; 26:321-325.
12. Hunter D, Padilla S. Influence of storage conditions on the stability of cholinesterase activity in plasma and brain tissue taken from carbamate or organophosphorus pesticide-treated rats. Tox Meth 1999; 9:189-199.
13. Moss D, Henderson A, Kachman J. En: C Burtis. editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994. p.877-882.
14. Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Metepec, México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. ECO/OPSIMS; 1991.
15. O'Malley M. Clinical evaluation of pesticida exposure and poisonings. The Lancet 1997; 249: 1161-1166.
16. Marquardt S. Pesticidas, parakeets, and unions in the Costa Rica banana industry, 1938-1962. Lat Amer Res Rev 2002; 37(2):3-36.
17. Fernández L. Manejo seguro de plaguicidas. Agroindustria. San José, Costa Rica: Leuper S.A; 1983.
18. Shulze H, Schmid R, Bachmann T. Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase-biosensors and simple solvent extraction. Anal Bioanal Chem 2002; 372: 268-272.
19. Concepción M. Detección "in vitro" del grado de inhibición en las colinesterasas humanas, sérica y eritrocítica, por plaguicidas organofosforados y carbamatos de mayor uso en Costa Rica. Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica para optar por el grado de Magister Scientae. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología; 2000.
20. Henderson A, Moss D. Enzymes. En: Burtis C A, Ashwood E R, editors. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 5 ed. New York: W. B. Saunders Company; 2002. p 385-387.
21. Vaquerazo B. Establecimiento de controles normativos (restricciones y prohibiciones) a los plaguicidas sintéticos. Memoria: El uso de plaguicidas y su relación con el desarrollo en Costa Rica, OPS/OMS Proyecto PLAGSALUD, San José, Costa Rica. 2001.
22. Chavarri E. Situación general del uso de agroquímicos en Costa Rica, su impacto en la salud y el ambiente. Memoria: El uso de plaguicidas y su relación con el desarrollo en Costa Rica, OPS/OMS Proyecto PLAGSALUD, San José, Costa Rica. 2001.

Recibido: 11-03-2004

Aceptado: 18-10-2004

Physicochemical properties of Venezuelan breadfruit (*Artocarpus altilis*) starch

Alicia Mariela Rincón, Fanny C. Padilla

Unidad Análisis de Alimentos, Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas

SUMMARY. *Artocarpus altilis*, seedless variety, is a fruit-producing plant which is cultivated in Margarita Island, Venezuela, and is consumed by the inhabitants of the region. Its chemical composition and physical characteristics were determined. The chemical (AOAC and AACC methods), physicochemical, morphometric characteristics, viscoamylographic properties and digestibility *in vitro* of starch from *Artocarpus* were studied. The starch yield was 18.5 g/100 g (dw)w with a purity of 98.86%, 27.68 and 72.32% of amylose and amylopectin, respectively. Scanning electron microscopy showed irregular-rounded granules. Swelling power, water absorption and solubility values were determined and found to be higher than that of corn and amaranth starch. The amylographic study showed a gelatinization temperature at 73.3°C, with high stability during heating and cooling cycles. *Artocarpus* starch could also be categorized in the group of mixed short chain branched/long chain branched glucan starches, this agrees with digestibility results that showed a high degree of digestibility *in vitro*. These results might be advantageous in medical and food use.

Keywords: *Artocarpus altilis* starch, chemical composition, physicochemical properties, pasting characteristic.

RESUMEN. Propiedades fisicoquímicas del almidón de *Artocarpus altilis* (pan de año) cultivado en Venezuela. *Artocarpus altilis*, variedad sin semilla, es un fruto cultivado en la isla de Margarita, Venezuela, y consumido por los habitantes de la región. El objetivo de este estudio fue evaluar la composición química y características físicas del fruto (Métodos del AOAC y AACC), y la composición química, características fisicoquímicas, morfométricas, propiedades reológicas y la digestibilidad *in vitro* del almidón aislado de *Artocarpus*. El rendimiento del almidón fue de 18,3 g/100g (bs), con una pureza de 98,86% y un contenido de 27,68% amilosa y 72,32% amilopectina. La microscopía de barrido electrónico mostró gránulos redondeados e irregulares. Los resultados muestran valores de poder de hinchamiento, solubilidad y absorción de agua más elevados que los de almidones de maíz y amaranto. El estudio amilográfico mostró una temperatura de gelatinización de 73,3°C, con una gran estabilidad durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento. Asimismo, permite clasificar al almidón en el grupo de glucanos mixtos con ramificaciones de cadena corta y cadena larga; que concuerda con el alto grado de digestibilidad del almidón *in vitro*. Estos resultados podrían ser de utilidad para uso farmacéutico y alimentario.

Palabras clave: Almidón de *Artocarpus altilis*, composición química, propiedades fisicoquímicas, características de "pasting".

INTRODUCTION

The breadfruit (*Artocarpus altilis*), which is native to Polynesia, is a large, round, starchy fruit borne by a tree. The plant belongs to the Moraceae, a family of about 50 general and over 1000 species (1), and was introduced in Venezuela in 1780 as a food for slaves. Breadfruit is also widely distributed in Central and South America including Colombia, Guatemala, Costa Rica and Brasil, the Virgin Islands, Jamaica, St. Vincent, and Pto Rico. There are two varieties, with either seeded or seedless fruits. The seedless fruits are considered a non-conventional food product, consumed and cultivated only in the central and northeastern Venezuela regions, where is known as "pan de año", "pan de name or "topan", in other regions is called "panapen". The seeded fruits are brown and chestnut like. Seedless fruits harvested before complete maturity are consumed boiled or deep-fried as chips. Although many people in other parts of the world have heard of breadfruit, few have eaten it.

Some varieties have been studied and are appreciated for their nutritional properties because they are rich in carbohydrates, lipids and proteins (2-5). Variation in carbohydrate composition (starch content and free sugar) of the fruit of the soft and firm varieties of *Artocarpus heterophyllus* Lam have been reported (5). Free sugars and fatty acid of different parts of jack fruit (*A. heterophyllus*) have been isolated (6). Functional properties (*A. heterophyllus*) seed flour, and the baking properties of *A. altilis* flours have been studied (1-7). Studies on the chemical composition for the seedless and seeded varieties have shown a protein content of 15.10 and 1.70 g/100 g, fat 29.0 and 0.30 g/100 g and moisture 20.20 and 70.80 g/100g respectively (2,7).

Bread prepared with 30 % of *A. altilis* flour did not show any significant difference with bread made with 100 % wheat flour, and a substitution of 10 % gave the best pasting characteristics (1). Nutritional value of composite flours and of the dried meal were evaluated (8), and some of the starch properties obtained from immature fruits have been studied (3).

Although the major commercial sources of starch are cereal grains seeds (maize, wheat, rice), tubers (potato) and certain roots (sweet potato, cassava), several potential non conventional sources have been reported (9-11). One of the potential alternative sources of commercial starch could be the seedless fruit of *A. attilis* due to its high yield.

Literature survey reveals little work on the physical characteristics, chemical properties and digestibility *in vitro* of *A. attilis* starch. Since the chemical composition and physical characteristics of a given starch are typical of its biological origin (12), the purpose of the present study was to characterize this starch and provide information on its composition, morphology, selected physico-chemical characteristics, and assessment of its pasting properties and *in vitro* digestibility.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Fifty two samples of immature fruits of *Artocarpus*, seedless variety, were collected in Margarita Island, Venezuela. All analyses were performed with analytical grade reagents, and results expressed as mean \pm standard deviation (SD) of $n=3$.

Morphology, chemical composition and physical characteristics of fruits samples

Fruits of *A. attilis* were analyzed for their physical attributes: morphology, size and weight. Size was evaluated on a representative sample of fruits (100), by measuring length and width using a measuring tape. Fruits were peeled manually and the peeled material (edible portion) was weighed. Yield was calculated from the following equation:

$$\text{Yield} = (\text{wt of edible portion}) / (\text{wt of whole fruit}) \times 100$$

$$\text{Peel fraction} = 100 - \text{Yield}$$

Peeled fruits were sliced and dried in a Labline Imperial oven at 45 °C for 24 h, followed by milling in a Braun food processor to obtain a flour or meal which was sifted through a 60 mesh sieve and stored at room temperature in plastic bags.

Chemical composition of the flour was determined by the AOAC official methods (13). Soluble and insoluble fiber by Mañas and Saura-Calixto method (14).

Starch extraction and chemical composition

Starch extraction was based on that described by Rincón *et al* (10). Briefly, the seedless fruits of *Artocarpus* were washed, peeled and pulp suspended in large quantities of distilled water, blended for 1 min in a Oster blender, at medium speed. The homogenate was filtered through a muslin bag. The filtrate was centrifuged and the supernatant was decanted. The starch was washed several times with distilled water and

dried at 45°C for 24 h, and stored at room temperature in plastic bags. Quantitative evaluation of moisture, ash and nitrogen were performed by the standard methods of the AACC (15). Total lipids were determined by Schoch method (16), and the pH and acidity using Smith method (17).

Apparent amylose content

Quantitative estimation of apparent amylose was determined by the method of Ratnayake *et al* (18), slightly modified. Starch (20 mg, db) was dissolved in 90% dimethylsulfoxide (3 ml) in 10 ml screw-cap reaction vials. The content of the vials was vigorously mixed for 2 min and then heated in a water bath (with intermittent shaking) at 85°C for 15 min. The vials were then cooled to ambient temperature, and the content diluted with water to 25 ml in a volumetric flask and sonicated for 10 min. 1.0 ml of the diluted solution was mixed with 40 ml of water and 5 ml I₂/KI solution (0.0025 M I₂ and 0.0065M KI) and then adjusted to a final volume of 50 ml. The contents were allowed to stand for 15 min at ambient temperature, before absorbance measurements at 600 nm. The amylopectin content was obtained by difference.

Scanning electron microscopy (SEM)

Granule morphology was determined by scanning electron microscopy (SEM), using a Hitachi electron microscope, model S 2400 at 20 kV. Samples were mounted, and the sample holder was sealed with silver paint and coated with gold/palladium at 8-10mA for 10 min, under low pressure less than 10 torr.

Swelling power, solubility and water absorption

Swelling, water absorption, and solubility determinations were carried out at a temperature range of 60 ° to 90 °C. An appropriate amount of the starch (2 g, db) was accurately weighed and quantitatively transferred with distilled water into a dry, 500 ml Pyrex flat bottom flask with three angle necks and t-joints. Sufficient distilled water was added to give 200 ml total suspension volume. A magnetic stir bar was placed inside the flask. The central neck was connected to a reflux condenser, which in turn was attached to a support stand by a single clamp. In the right neck a thermometer was placed attached to a rubber stopper and the left neck was covered with a rubber stopper. The system was placed on a hot, porcelain top, magnetic stirrer and heated from 65 °C up to 95 °C at a uniform rate (1.5 °C/min increments) under constant stirring (75 rpm). At each 10 °C temperature increment, an aliquot of 10 ml was taken and placed into a tared centrifuge tube, and centrifuged 15 minutes at 2200 rpm. Using a glass tube attached to a clean dry suction flask, all supernatant was removed from settled paste. Each solution was transferred to a tared, 50-ml nickel evaporating dish and evaporated to dryness on a steam bath. The dishes were dried for 4 hours in a

vacuum oven at 65 °C, cooled in a desiccator, and weighed. The centrifuge tubes with settled paste were weighed. The following calculations were used:

$$W_1 = [\text{Starch weight (dw)} / \text{Starch weight (fw)} + 200] \times 100$$

$$W_2 = [A \times W_1] / 100$$

$$W_3 = W_2 - b$$

$$\%SS = \text{Soluble Solids} = [b / W_2] \times 100$$

$$WA = \text{Water Absorption (g water/g starch)} = [a - W_3] / W_3$$

$$SP = \text{Swelling Power} = [a \times 100] / W_2 \times (100 - \% S.S.)$$

$$W_1 = \% \text{ Starch (dw) in suspension}$$

$$W_2 = \text{Starch content in each aliquot}$$

$$W_3 = \text{Residual starch in each aliquot (settled paste)}$$

$$A = \text{Weight of aliquot (g)}$$

$$a = \text{Weight of settled paste}$$

$$b = \text{Weight of dry residue}$$

$$dw = \text{Dry weight}$$

$$fw = \text{fresh weight}$$

Results used for calculations were means of triplicate measurements.

Brabender viscosography

A Brabender viscosographic amylogram of a 6.0 g/100 mL slurry was obtained on a Brabender Micro visco-amylograph following the procedure and condition described by the manufacturer. The aqueous starch suspension was heated from 50°C to 95°C, kept at this temperature for 5 min and then cooled to 50 °C and held at this temperature for 1 min. Speed rotor was fixed at 75 rpm and the rate of heating and cooling was 7.5°C.min⁻¹ throughout the range of gelatinization, holding and cooling steps. Amylogram parameters and determination of breakdown and setback points were calculated by the viscosograph program for Windows N° 72300 (software) and analyzed according to Rasper (19). The peak of viscosity (P), hot paste viscosity (H, viscosity after 5 min stirring at 95 °C) and cold paste viscosity (C, viscosity after cooling to 50°C) were recorded. Breakdown (BD) is the viscosity difference between the maximum viscosity (P) and the hot paste viscosity (H). Setback (SB) is the viscosity difference between viscosity at 50°C (C) and viscosity at 95°C (P). Additionally, in order to monitor disintegration behavior upon controlled energy input and accompanied tendencies to reconstitute super molecular glucan structures, Brabender viscosity was determined for 10 % (w/v) aqueous starch suspensions, according to Praznik method (20), with some modification as follows: a heating program from 30 to 90°C, kept at this temperature for 5 min, and then the cooling period started and maintained till the end of the study (22min).

Light transmittance of starch pastes

The light transmittance of starch pastes was carried out

according Hoover *et al* method (21). Starch pastes were prepared at 1% (w/v) by weighing 50mg (db) and suspended in 5ml of water in screw cap tubes and the pH was adjusted by addition of 0.1N HCl or NaOH as required between pH 2 and 14. The tubes were heated in a boiling water bath, with occasional shaking, for 30 min. After cooling to ambient temperature, the transmittance percentage (%T) at 650 nm was determined against a water blank in a Genesis 2 spectrophotometer.

In vitro starch digestibility

Estimation of *in vitro* digestibility by pancreatic α -amylase of *A. altilis* starch was assessed by a colorimetric assay method (22). Percentage of starch hydrolysis was calculated as follows:

$$\% \text{ starch hydrolysis} = \frac{\text{mg glucose}}{\text{mg starch (dry basis)}} \times 0,90 \times 100$$

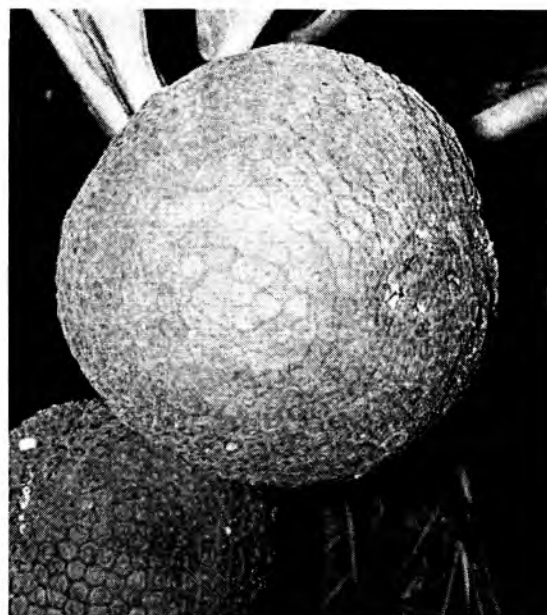
RESULTS AND DISCUSSION

Morphology and physical characteristics of fruits

Breadfruit (*A. altilis*) fruits are round with a smooth surface and a diameter between 12 to 35 cm Figure 1. The whitish to pale yellow pulp presented a weight range of 233.7- 656.6 g. The edible portion was 88.64 g/100 g, and a waste (peel) of 11.36g/100 g.

FIGURE 1

Morphological appearance of *Artocarpus altilis*, seedless variety



Proximal composition

The results are shown in Table 1. The moisture content of the fresh fruits, and the chemical composition of the flour. Carbohydrate content as well as its composition in starch, and fiber: insoluble (lignin, resistant starch, and resistant protein), and soluble (as neutral sugars and uronic acid) are comparable to the results reported for *A. Heterophyllus* (5). Protein content (15.09 g/100 g) is similar to one reported for *A. Heterophyllus* (7), but much higher than the one reported for the same specie (1), and for *A. communis* (8). The soluble and insoluble dietary fiber as well as the starch content were comparable to values reported in different varieties of *A. heterophyllus* (5). The low starch content is probably due to the maturity stage, variety, different climatic and agronomic conditions. Results for protein and soluble and insoluble dietary fiber are likely to make this fruit of nutritional and physiological importance.

TABLE 1

Chemical composition (g/100 g) and some physical characteristics of seedless variety of *Artocarpus altilis* fruit, flour, and starch ¹

Characteristics	Fruit	Flour	Native Starch
Yield			18.50
Moisture	61.08 ± 0.06	10.43 ± 0.06	13.59 ± 0.56
Ash		7.17 ± 0.04	0.47 ± 0.04
Protein (N x 6.25)		15.09 ± 1.58	0.61 ± 0.01
Total lipids		3.04 ± 0.12	0.06 ± 0.01
Insoluble fiber ²		43.67 ± 0.47	
Soluble fiber ³		4.70 ± 0.26	
Total carbohydrates (by difference)			98.86
Apparent amylose			27.68 ± 0.75
Amylopectin (by difference)			72.32
pH			5.51
Titrateable acidity (meq.g ⁻¹)			2.77 x 10 ⁻³
Granule: shape			Irregular, rounded
Diameter (µm) n = 12			3.03 – 7.88

¹ Dry basis and represent means ± standard deviation of n= 3

² Include dietetic fiber, lignin, resistant starch and protein resistant

³ Determined like neutral sugars and uronic acid

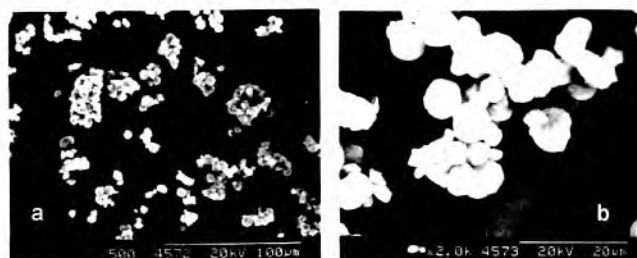
Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy of *A. altilis* starch granules is presented in Figure 2 (a, b). The starch granules have a rounded irregular shape, with some surface indentations, and a width and length diameter range of 4.24 – 6.67 µm and 3.03 – 7.88 µm, respectively. Indentations might be caused by

compression of small starch granules or protein bodies during the early development stages in the amyloplast. Fissures suggest that the extraction and purification procedure were somewhat drastic.

FIGURE 2

Artocarpus altilis starch granules photomicrographs



Starch chemical composition

Proximate analysis and yield are shown in Table 1, as well as some of the physical properties of the breadfruit starch. 18.50 g/100 g (dw) yield is somewhat low, nevertheless one has to consider that during the extraction and purification procedure there is some loss. The purity of the starch (98.86 g/100) was judged on the basis of composition and microscopic observation. A low protein content of 0.06 g/100 g corroborates this, which is similar to values reported (3). Amylose content was higher than the results presented in the literature (3) for two different varieties of *Artocarpus* (16.4 and 18.2).

Swelling, water absorption and solubility

The results are presented in Table 2. Swelling of starch granules is the first stage in the initiation of changes in hydration related properties. The swelling power of the *A. altilis* starch increased with temperature. This increase was more pronounced within 70 – 80°C, and values are higher than the ones previously reported (3). The swelling power have been related to the associative binding within the starch granule, and apparently, the strength and character of the micellar network is related to the amylose content of the starch; low amylose content, produces high swelling power(23). However, these results are much higher when compared with the ones reported for amaranth (6.57 g/100 g amylose) and corn (17.00 g/100 g amylose) (24). As a result of swelling there is an increment in solubility, showing the highest value at 90°C. These results are also similar to the ones reported for African breadfruit (4). Increased solubility could be

attributed to the amylose content, since the solubilized amylose molecules leach from the swelled starch granules.

TABLE 2
Physicochemical properties of native starch from *A. altilis*
(seedless variety)

Temperature (°C)	Swelling power	Solubility (g/100 g)dw	Water absorption (g/100 g)dw
60	35.7 ± 0.11	2.31 ± 0.17	2.70 ± 0.11
70	46.9 ± 0.35	2.75 ± 0.26	3.69 ± 0.36
80	144.9 ± 0.12	5.28 ± 0.24	13.49 ± 0.13
90	238.1 ± 2.17	8.93 ± 2.8	22.81 ± 2.18

All data represent mean ± standard deviation n = 3

Water absorption capacity and gelatinization temperature are specific for each type of starch, and they depend on several factors such as size of granules, amylose/amylopectin ratio, and intra and inter molecular forces. The breadfruit starch presented a lower absorption of water below 70°C; this can be explained by the slow dispersion that polymers show when they are added to a solvent and the separation and absorption of moisture by particles do not take place before the swelling occurs. This is due to the degree of intermolecular association within the starch granule. Water absorption is also dependent on the size of the starch granule: the smaller the size of the granules, the higher the absorption capacity.

Viscoelastic behavior

In the presence of water and heat, starch granules swell by imbibing water. As the temperature is increased the gelatinization temperature is reached after which a paste is formed. Pasting properties of *Artocarpus* starch are given in Figure 3 and Table 3. According to Brabender viscoamylograph, the gelatinization temperature of a 6.0 g/100 g of *Artocarpus* starch paste was found to be 73.3 °C. This value is higher than that of potato starch (61.6 °C) but much lower than that of maize starch (83.3 °C)(24). The gelatinization temperature depends on the size of the starch granule; small granules are more resistant to rupture and loss of molecular order, so this might explain the relatively high gelatinization temperature. After gelatinization, the viscosity of starch increases markedly, mainly because of lack of water which acts as a lubricant between the swollen granules. The peak viscosity (P) at any concentration is an important distinguishing feature of a given starch from other species of starch. *Artocarpus* starch shows a peak viscosity value of 790 BU. Peak viscosity (P) of *Artocarpus* starch is similar that of *Dioscorea* starch (781 BU)(25) but higher than that of maize starch (302 BU). Viscosities of maize and potato starches decrease during the isothermal holding (24), while for

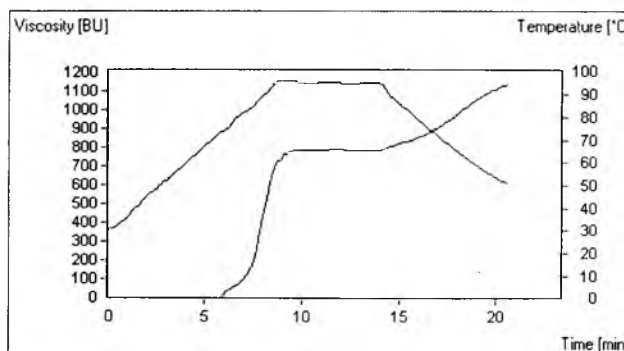
Artocarpus starch viscosity increases during this period. The hot paste viscosity (H) has been attributed to the mixed effect of swollen starch granules, granule fragments, dispersed colloidal starch molecules, molecularly dispersed starch molecules, rate of amylose exudation, and competition between exuded amylose and remaining granules for free water (25). *Artocarpus* starch maintains its structural integrity under shear and heat as the breakdown in hot paste viscosity is only 4 BU, compared to other starches (24,25). *Artocarpus* starch could be used in food products that will require continuous heating like those for children and the elderly. When hot starch paste is cooled, the extent of viscosity increase is governed by the starch retrogradation tendency. This behaviour is largely determined by the affinity of hydroxyl groups of one molecule for another. Amylose molecules being randomly dispersed can orient themselves in parallel fashion to form aggregates of low solubility, leading to gel formation (25). The cold paste viscosity (C: 1091 BU) of *Artocarpus* starch was greater than its corresponding peak of viscosity (P:790 BU). Hence, it may be assumed that on cooling the viscosity of *Artocarpus* starch rises due to the high retrogradation tendency of the amylose fraction.

TABLE 3
Viscographic characteristics of 6.0 g/100 ml *A. altilis*
(seedless variety) native starch. n = 3

Parameter	BU
Gelatinization temperature	73.3 °C
Peak viscosity (P)	790
Hot paste viscosity (H)	786
Cold paste viscosity (C)	1091
Breakdown (P-H)	4
Setback (C-P)	305

BU = Brabender units

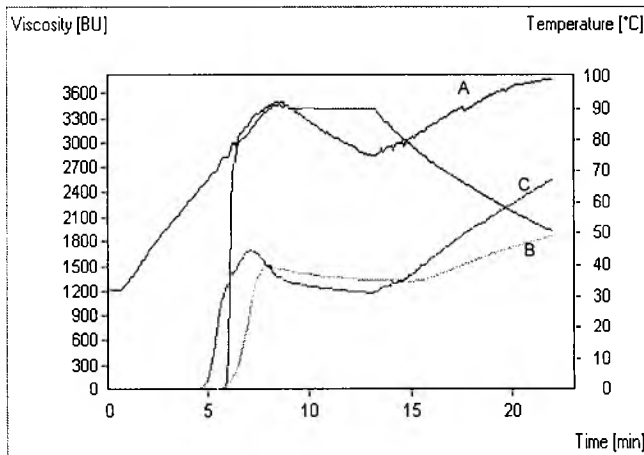
FIGURE 3
Brabender pasting curves for *A. altilis* starch
(seedless variety) at 6.0 % aqueous suspensions



Brabender viscosity was also determined for a 10% suspension, even though such a high concentration is atypical, but it was applied because, for wheat, a reasonable response could be achieved only at such concentration, and it was a way to compare *Artocarpus* starch behavior. This test was introduced to monitor disintegration behavior upon controlled energy input and accompanied tendencies to re-constitute supermolecular structures.

The amylograph (Figure 4) shows that maize starch has a similar disintegration in the initial temperature raising period as does wheat. At similar temperatures maize and wheat disintegrate in a similar way. Further increase in temperature reduced viscosity for wheat by increasing the mobility of disintegrated components. In the cooling period, mobility of glucans is reduced and thus, viscosity smoothly rises again for wheat and with less intensity for maize.

FIGURE 4
Brabender pasting curves for *A. altilis* starch (seedless variety)[A], maize [B], and wheat [C] at 10% aqueous suspensions



Artocarpus starch disintegrates much more strongly, which causes an enormous increase in viscosity. Further increase in temperature produces higher viscosity and disintegration takes place more slowly. Super molecular structures of *Artocarpus* starch are seriously disintegrated, but exhibited a high glucan/glucan interaction potential. In the cooling period viscosity increases indicating a tendency to re-constitute super molecular structures. Similar characteristics were observed for wheat but at lower temperatures.

When comparing these results with those of Praznik *et al.*(20), performance of *Artocarpus* starch could be similar to buckwheat starch, which is categorized on the group of mixed short chain branched/long chain branched glucan starches. When comparison is made taking in consideration [BU] ratio $T_{30^{\circ}\text{C}}/T_{90^{\circ}\text{C}}$ (Table 4) then *Artocarpus* starch (1.39) is similar to quinoa (*Chenopodium quinoa*) (1.5), which is considered by

Praznik *et al.*(20) a short chain branched glucan starch. Further studies should be performed in order to elucidate the real structure of *Artocarpus* starch glucans.

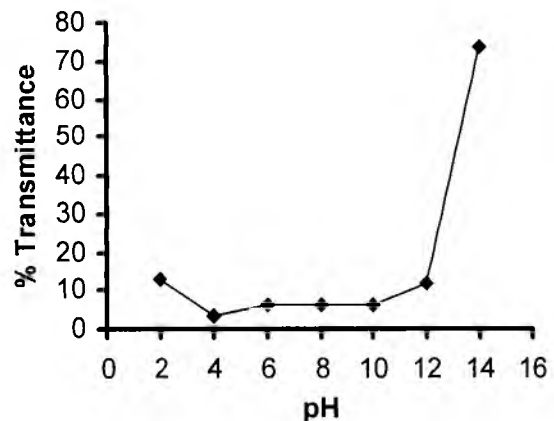
TABLE 4
Brabender viscograph characteristics of 10g/100 mL aqueous starch suspensions of wheat, maize and breadfruit

	Wheat	Breadfruit	Maize
[BU] _{max}	1704	3509	1523
T at [BU] _{max} (°C)	82	90	89
[BU] at the end of T=const=90°C	1177	2860	1336
[BU] end of 90° ->30°C cooling	2550	3971	1874
[BU] ratio $T_{30^{\circ}\text{C}}/T_{90^{\circ}\text{C}}$	2.17	1.39	1.40
Increase in [BU] _{90^{\circ}\text{C} \rightarrow 30^{\circ}\text{C}} (%)	116.65	38.85	40.27

Light transmittance of starch pastes

The results of transmittance (%T) measurement differed at all pH levels. Figure 5. *Artocarpus* starch showed a lower %T at neutral pH compared to the alkaline pH. The starch chains increase their negative charges and association with increasing pH, this effect occurred rapidly between pH 10 and 14. This result is similar to the one reported by Craig *et al* (26). When a beam of light passes through native starch granules, a large proportion of the light is reflected back and the starch appears white and opaque due to the surface of the granule being larger than the wavelength of light (26). These authors proposed that the separation of starch chains during gelatinization decreases the reflection ability of starch granules and thus, increases the %T of starch paste. They also showed that amylose-lipid inclusion complexes decrease the %T of starch paste, and that %T increases with the degree of swelling. These results suggest that *A. altilis* starch might have lipid complexed amylose, since it shows a low %T

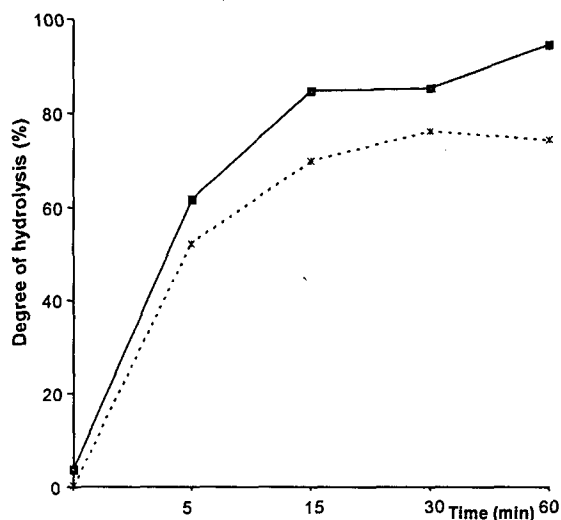
FIGURE 5
Effect of pH on light transmittance of *A. altilis* starch



In vitro digestibility studies

Digestion of starch samples was performed with α -amylase and the results are shown in Figure 6. Digestibility of *Artocarpus* and wheat starches, represented as percentage of hydrolysis at 60 min were 93 and 74% respectively. Digestibility of *Artocarpus* starch was higher than wheat starch. Literature shows that amylose rich starch is difficult to swell or to gelatinize, and it is digested slowly because of higher crystallinity in the structure due to extensive hydrogen bonding (27). Other studies report that retrogradation of amylose in starch generally suppresses the reaction with amylolytic enzymes (28). However, it is believed that the amylose content is not the only factor influencing digestibility and that digestion is a complicated procedure affected by many factors such as amylopectin structure, gelatinizing temperature and phosphorus content besides, the amylose content. A plausible reason for the high digestibility is that the amylopectin in *Artocarpus* starch might contain a larger amount of longer branched chains, which is suggested by the results of the amylo-viscographic study.

FIGURE 6
Artocarpus and wheat starch digestibility



CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

From these results it can be concluded that the *A. altilis* (Breadfruit) starch showed a high degree of purity, and has a tendency to retrogradation. The physicochemical and rheological characteristics suggest that this starch could be useful in products that require long heating processes. The excellent digestibility of *Artocarpus* starch might be advantageous for medical and food use.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant of the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) [PI 06.30.4358.99], and the Instituto de Investigaciones Farmaceuticas (IIF) of the Pharmacy Faculty, Universidad Central de Venezuela.

REFERENCES

- Eusoso K, Bamiro F. Studies on the baking properties of non wheat flours I. Breadfruit (*Artocarpus altilis*), *Int J Food Sci and Nutr*, 1995; 46: 267-273.
- Duke J, Alan A. *Handbook of proximate analysis tables of higher plants*. CRC Press Inc. Boca de Raton, 1986.p. 21.
- Tumaalii F, Wooton R. Properties of starch isolated from Western Samoan breadfruit using a traditional method. *Starch/Starke*, 1988; 40: 7-10.
- Akubor PI. Proximate composition and selected functional properties of African breadfruit and sweet potato flour blends. *Plant Food for Human Nutr*, 1997; 51:53-60.
- Rahman MA, Nahar N, Jabbar Mian A, Mosihuzzaman M. Variation of carbohydrate composition of two forms of fruit from jack tree (*Artocarpus heterophyllus* L.) with different maturity and climatic conditions. *Food Chem*, 1999; 65: 91-97.
- Chowdhury FA, Raman Md. A, Mian A.J. Distribution of free sugars and fatty acids in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Food Chem*, 1997; 60: 25-28.
- Singh A, Kumar S, Singh IS. Functional properties of Jack fruit seed flour. *Lebensm Wiss u Technol*, 1991; 24: 373-374.
- Nochera C, Caldwell M. Nutritional evaluation of breadfruit containing composite flours products. *J Food Sci*, 1991; 57: 1420-1451.
- Gebre-Mariam T, Ababa A. Some Physicochemical Properties of Dioscorea starch from Ethiopia. *Starch/Starke*, 1998; 60: 241-246.
- Rincón A.M, Padilla FC, Araujo C, Tillett S. *Myrosma cannifolia*, chemical composition and physicochemical properties of the extracted starch. *J Sci Food and Agric*, 1999a; 79: 532-536.
- Rincón AM, Pérez E, González Z, Rodríguez P. Microstructural changes of *Canavalia ensiformis* starch modified by thermal methods. *Food Sci Tech Int*. 1999b; 5:31-40.
- Zobel H, Stephen A. Starch: structure, analysis, and application. In: *Food Polysaccharides and their applications*. Ed by A. M. Stephen. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995. pp.19-66.
- AOAC. *Official Methods of Analysis*, 15 Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington,DC. 1990.
- Mañas E, Saura-Calixto F. Ethanolic precipitation: a source of error in dietary fibre determination. *Food Chem*, 1993; 47: 351-355.
- AACC. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists(AACC)*, St. Paul, MN, USA. 1993.
- Schoch TJ. Fatty substances in starch. In: *Methods in Carbohydrates Chemistry*. Ed by Whistler, R.L, Academy Press. New York, 1964a. pp.56-61.

17. Smith R. Characterization and analysis of starch. In: *Starch/ Chemistry and Technology*. Ed by Whistler, R.L. and Paschall, E.F., Academic Press. New York, 1967. pp.569-635.
18. Ratnayake WS, Hoover R, Shahidi F, Perera C, Jane J. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Food Chem*, 2001; 74: 189-202.
19. Rasper V. Theoretical aspects of amylographology. In *The amylograph Handbook*. Ed by Shuey W.C, & K.H. Tipples. The American Association of Cereal Chemists. St Paul, 1980. pp 1-6.
20. Praznik W, Mundigler N, Kogler A, Pelzl B, and Huber A. Molecular background of technological properties of selected starches. *Starch/Starke* 1999; 51:197-211.
21. Hoover R, Swamidas G, Kok LS, and Vasanthan T. Composition and physicochemical properties of starch from pearl millet grains. *Food Chem*. 1996; 56:355-367.
22. Holn J, Björck I, Asp NG, Sjöberg LB, Lundquist I. Starch availability *in vitro* and *in vivo* after flaking, steam-cooking and popping of wheat. *J Cereal Sci*, 1985; 3: 193-206.
23. Calzetta AN, Tolaba MP, and Suarez C. Some physical and thermal characteristics of amaranth starch. *Food Sci and Techn Intern* 2000; 6: 371-378.
24. Gebre-Mariam T and Schmidt PC. Isolation and physicochemical properties of enset starch. *Starch/Starke*, 1996; 48 :208-214.
25. Gebre-Mariam T, Ababa A, and Schmidt PC. Some Physicochemical Properties of Dioscorea Starch from Ethiopia. *Starch/Starke*, 1998; 50:241-246,
26. Craig SAS, Maningat CC, Seib PA, & Hosney RC. Starch paste clarity. *Cereal Chem*. 1989; 68:173-182.
27. Panlasigui LN, Thompson BO, Juliano CM, Perez C.M, Yiu SH, and Greenberg GR. Rice varieties with similar amylose content differ in starch digestibility and glycemic response in humans. *Amer J Clin Nutr*. 1991; 54:871-877.
28. Berry CS, Anson KI, Miles MJ, Morris VJ, Russel P.L. Physicochemical characterization of resistant starches from wheat. *J Cereal Sci*, 1988; 8:203-206.

Recibido: 31-05-2004

Aceptado: 19-01-2005

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). Escribase o imprímase solamente sobre una cara del papel. Utilícese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

Página del título

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

Autoría

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

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

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

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

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

Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (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. Utilícese para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de temas médicos] del Index Medicus; en el caso de términos de reciente aparición que todavía no figuren en dicha lista, podrán usarse las expresiones corrientes. ALAN exige que todo trabajo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen debe presentarse en español, igualmente con sus palabras clave.

Introducción

Expresé el propósito del artículo y resuma el fundamento lógico del estudio u observación. 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 identifícalas 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 responses. *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

Enzensberger W, Fischer PA. Metronome in Parkinson's disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.
Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

13. Artículo que contiene una retractación

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. En: *Nat Genet* 1994;6:426-31]. *Nat Genet* 1995;11: 104.

(2) Evidentemente "extranjero" se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencia bibliográfica se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos (N. Del t.).

14. Artículo retirado por retractación

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado *por retractación* en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3127]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:1083-8.

15. Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en West J Med 1995;162:278]. West J Med 1995; 162:28-31.

Libros y otras monografías

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser.)

16. Individuos como autores

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. Directores ("editores"), compiladores como autores

Norinan II, 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 MJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. Tesis doctoral

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

24. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.

Otros trabajos publicados**25. Artículo de periódico**

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. Documentos legales

Ley pública:

Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sess. (1995).

Código de normas federales:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

28. Mapa

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. Libro de la Biblia

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. Diccionarios y obras de consulta semejantes

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. Obras clásicas

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Trabajos inéditos**32. En prensa**

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. *N Engl J Med*. En prensa 1996.

Material en soporte electrónico**33. Artículo de revista en formato electrónico**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 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, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: *, †, ‡, †, **, ††, ‡‡.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media.

No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros. Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento cabal que corresponde. Incluir un número excesivo de cuadros en relación con la extensión del texto puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas. Examine varios números recientes de la revista a la que planea presentar el artículo y calcule cuántos cuadros pueden incluirse por cada millar de palabras de texto. Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que los cuadros suplementarios que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensos para publicarlos, queden depositados en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionados por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos cuadros se presentarán junto con el artículo para su consideración.

Ilustraciones (figuras)

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma. No escriba directamente sobre el dorso de las figuras ni las sujete con broches para papel, pues quedan marcadas. Las figuras no se doblarán ni se montarán sobre cartón.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en estas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quién sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

Pies o epígrafes de las ilustraciones

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, *peso* y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiplos y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

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.

INDICE GENERAL DEL VOLUMEN 54-2004

EDITORIAL	5
XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición	6
Presentación	S 7
NOTA EXPLICATIVA. Publicación duplicada	135

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 María Goretti. Pessoa de Araújo Burgos; Francisca. Martins Bion; Florisbela. Campos	25
Frutos secos y riego cardio y cerebrovascular. Una perspectiva española Meritxell. Nus; Mar. Ruperto; Francisco J. Sánchez-Muniz.....	137
Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides Antonio J. Meléndez-Martínez; Isabel M. Vicario; Francisco J. Heredia.....	149
Hiponatremia en esfuerzos de ultraresistencia: efectos sobre la salud y el rendimiento Francisco B. Ortega Porcel; Jonatan. Ruiz Ruiz; Manuel J. Castillo Garzón; Ángel. Gutiérrez Sainz	155
Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia Silva L. C. Martins; Heliênia F. Silva; María Rita. Carvalho Garbi Novaes; Marina Kiyomi Ito	257
Armonización de las recomendaciones nutricionales para Meso América: ¿Unificación regional o individualización nacional? Noel W. Solomons; Martha Kaufer- Horwitz; Odilia I. Bermúdez.....	363
Efectividad de un Programa Nacional de Fomento de la Lactancia Materna en Chile 1993-2002. Eduardo. Atalah; Cecilia. Castillo L; Cecilia Reyes A.....	374
El té verde ¿Una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares? Tania. Hernández Figueroa; Elena. Rodríguez – Rodríguez; Francisco J. Sánchez-Muniz	380
Hospital food handlers in Niterói, R. J, Brazil: intestinal parasitism Ana Eliza. Port Lourenço; Claudia María. Antunes Uchôa; Otilio Machado.....	395

TRABAJOS DE INVESTIGACION

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
--	----

Bioquímica Nutricional

Subpoblaciones linfocitarias en preescolares venezolanos de alto nivel socioeconómico Daisy. Llovera F; Liseti. Solano Rodríguez.....	196
---	-----

Influencia de la ingesta de calcio y fósforo sobre la densidad mineral ósea en mujeres jóvenes Beatriz. Basabe Tuero; María Carmen. Mena Valverde; Marta Faci. Vega; Aranzazu. Aparicio Vizquete; Ana María. López Sobaler; Rosa María. Ortega Anta.....	203
Lipemia postprandial en adultos jóvenes de diferentes etnias en Colombia Cecilia. Aguilar de Plata; María Teresa. Velasco de Echeverri; Beatriz. Gracia de Ramírez; Alberto. Pradilla Ferreira; Martha Liliana. Cruz Naranjo; Mildrey. Mosquera Escudero	264
Efecto de un desayuno con alto contenido en grasas o en carbohidratos sobre el perfil de lípidos posprandial en individuos sanos con y sin antecedentes familiar de diabetes mellitus tipo 2 Manuel.Gonzalez-Ortiz; Blanca R. Balcázar-Muñoz; José M. Mora-Martínez; Esperanza. Martínez-Abundis.....	274
Níveis plasmáticos de vitamina A e os resultados obstétricos e perinatais em gestantes portadoras do virus da imunodeficiência humana (HIV) Patricia. El Beitune; Geraldo. Duarte; Silvana María. Quintana; Hélio.Vannucchi; Ernesto Antonio. Figueiró-Filho; Edson. Nunes de Moraes; Antonio Alberto. Nogueira.....	419

Ciencia de Alimentos

Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grado de <i>Phaseolus lunatus L.</i> Santiago.Gallegos Tintoré; Jessé.Pacheco Aguirre; David.Betancur. Ancona; 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
Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos Antonio J. Meléndez-Martínez; Isabel M.Vicario; Francisco J. Heredia.....	209
Evaluación de una metodología para determinar características de textura de tortilla de maíz (<i>Zea mays L.</i>) Gerónimo. Arámbula-Villa; J. Abraham. Méndez-Albores; Jesús. González-Hernández; Edmundo.Gutiérrez-Arias; Ernesto. Moreno-Martínez.....	216
Functional properties of a protein product from <i>Caryodendron orinocense</i> (Barinas nut) María de Jesús. Alfaro; Irama.alvarez; Sandra. El Khor; Fanny C.de Padilla.....	223
Evaluación microbiológica y fisicoquímica de bebidas pasteurizadas fortificadas con extractos de desechos desodorizados de naranja Mario José. Moreno Álvarez; Alejandra. Machado; Arelis. Padrón; David. García; Douglas Rafael. Belén Camacho.....	308
Adaptabilidad de híbridos de maíz dulce a la congelación en mazorcas Alejandra O. Ramírez Matheus; Norelkys Maribel. Martínez; Ligia O. de Bertorelli; Frank De Venanzi.	438
Detección de plaguicidas en vegetales de Costa Rica mediante la inhibición de colinesterasas humanas Kart Schosinsky.Nevermann; Eugenia.Quintana Guzman	444

2. Dieta Mediterránea

Dieta Mediterránea: características y beneficios para la salud Lluís Serra. Majen; Alicia. García Álvarez; Joy Nogo de la Cruz.....	S 44
El trigo, el pan y la pasta en la Dieta Mediterránea Carmen. Pérez Rodrigo; Virginia.Ruiz Vadillo.....	S 52
La calidad de las grasas: el aceite de oliva Carmen. Pérez Rodrigo; Virginia.Ruiz Vadillo.....	S 59
Frutas, verduras y hortalizas Javier. Aranceta.....	S 65
La Dieta Mediterránea y el mar: pescados Victoria. Arijá Val; Nancy. Babio; Joan. Fernández-Ballart; Lluís. Serra-Majem.....	S 72

El yogur: un alimento mediterráneo prebiótico

José Antonio. Mateos..... S 76

El vino en la Dieta Mediterránea

Rosa M. Lamuela-Raventós; Cristina: Andrés-Lacueva..... S 79

Composición nutritiva y efectos sobre la salud de los frutos secos

Megías-Rangil I; García-Lorda P; Torres-Moreno M; Bulló M; Salas-Salvadó J..... S 83

¿Existen deficiencias nutricionales en la Dieta Mediterránea?

Rosa María. Ortega; Ana María. López-Sobaler; Javier. Aranceta; Iluis. Serra Majem..... S 87

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

Latinfoods. Composición de Alimentos**El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes**

Cynthia Cristina. Arcila Lozano; Guadalupe. Loarca-Piña; Salvador. Lecona-Uribe; 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 I.M; Carvalho E.B; Cardoso C.B..... 118

Caracterización del almidón nativo de *Dioscorea bulbifera* L

Consuelo. Araujo Vizcarrondo; Alicia Mariela. Rincón; Fanny, Padilla..... 241

Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica

Adriana. Blanco-Metzler; Juscelino. Tovar; Mrireya. Fernández-Piedra..... 322

Perfil lipídico de 25 pescados marinos mexicanos con especial énfasis en sus ácidos grasos n-3 como componentes nutracéuticos

María Isabel. Castro-González; Anayté. Ojeda; José Luis. Solencio; Lorena. Cassi; Héctor. Ledesma; Fernando. Pérez-Gil..... 328

Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Moñostroma undulatum*, Wittrock

Adriana Alicia. Gallardo; Susana. Risso; María Angélica. Fajardo; Silvia Estevao. Belchior..... 337

Mineral content of the honey produced in Zulia state. Venezuela

Betzabé. Sulbarán de Ferrer; Graciela. Ojeda de Rodríguez; Jorge. Peña; Janeth. Martínez; María. Morán..... 346

Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* Link

Rozilaine A.P.G. Faria; Manuel. Andrade-Neto; Luciano. Silba Pinto; Rolando. Rivas Castellón; Juan J. Calvete & Venidlo. Sousa Cavada 349

Physicochemical properties of Venezuelan Breadfruit (*Artocarpus altilis*) starch

Alicia Mariela. Rincón; Fanny C. Padilla..... 449

Microbiología de Alimentos**Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157: H7**

Xenia. Barrantes; Dylana. Railey; María Laura. Arias; Carolina. Chaves..... 293

Evaluación del efecto de cultivos probióticos presentes en yogurt sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y la producción de termonucleasa	
Marlon. Salvatierra; Andrea. Molina; María del Mar; Gamboa; María Laura. Arias.....	298
Evaluación de la presencia de bacterias en alimentos y en el ambiente de una sección de oncología de un Hospital Nacional, San José, Costa Rica	
Fabiola. Jiménez; Laura. Garro; Evelyn. Rodríguez; Zenen. Zeledón.....	303
Prevalencia de <i>Cyclospora</i> sp., <i>Cryptosporidium</i> sp., microsporidios y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica	
Melvin. Calvo; Melissa. Carazo; María Laura. Arias; Carolina. Chaves; Rafael. Monge; Misael. Chinchilla	428
Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca proveniente de la zona norte de Costa Rica	
Graciela. Morales; Laura. Blanco; María Laura. Arias; Carolina. Chaves.....	433
Nutrición Animal	
Efectos de la incorporación de la dieta de los pigmentos carotenoides, sobre el desarrollo gonadal y la madurez de los ovocitos en hembras de trucha arco iris (<i>Onchorhynchus mykiss</i>, Walbaum, 1972)	
Genoveva. Ingle de la Mora; J. L.A. Arredondo-Figueroa; Irene de los Ángeles.	
Barriga-Sosa; J. Bazán-Arias; J. Vernon-Carter.....	235
Nutrición Clínica	
Excreción urinaria de deoxipiridinolina y su relación con la densidad mineral ósea, el estradiol sérico y los años de postmenopausia en mujeres mexicanas	
Rosa Olivia. Méndez Estrada; C. Jane Wyatt.....	408
Efecto de la suplementación oral con cobre en el perfil lipídico de pacientes venezolanos hiperlipémicos	
Alarcón-Corredor. OM; Guerrero. Y; Ramírez de Fernández. M; D' Jesús I; Burguesa M; Burguesa. JL; Di Bernardo ML; García MY; Alarcón AO.....	414
1. Nutrición Comunitaria	
Nutrición Comunitaria	
Javier. Aranceta.....	S 9
Estrategias educativas para la promoción del consumo de frutas y verduras en el medio escolar: Proyecto Pro Children	
Carmen. Pérez-Rodrigo; Javier. Aranceta; Johannes. Brug; Marianne. Wind; Christina. Hildonen; Knut-Inge. Klepp.....	S 14
Factores de éxito de los programas de seguridad alimentaria y nutrición	
Cecilio. Morón; Irela. Mazar.....	S 20
Acciones de intervención nutricia en situaciones de desastre: relato de cuatro experiencias mexicanas	
Herlinda. Madrigal-Fritsch; Liliana. Ruíz Arregui; Sara Elena. Pérez. Gil Romo; Leticia. Cervantes Turrubiates; Pilar. Torre Medina-Mora; Guadalupe. Ramírez García; Margarita. Escobar Pérez.....	S 24
Propuesta metodológica para incorporar la educación en nutrición en la enseñanza básica	
Sonia. Olivares; Cecilio. Morón; Juliana. Kain; Isabel. Zacarías; Margarita. Andrade; Lydia. Lera; Nora. Díaz; Fernando. Vio.....	S 33
Las mejores prácticas en nutrición comunitaria: retos y compromisos	
Lluís. Serra Majem.....	S 40
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 ; Juarez L 50

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

Larissa. Ribeiro Braga; María Alice. Rostom de Mello; Claudio Alexandre. Gobatto..... 58

Exactitud del índice de masa corporal en la predicción de la adiposidad medida por impedanciometría bioeléctrica

Fernando. Carrasco N; Eliana. Reyes S; Olga. Rimler S; Francisca Ríos C..... 280

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

José. Serrano; Isabel. Goñi 36

Prematurity and material 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; B.Chem; Arturo. Martí-Peña; Carolina. Medina-Laurentín 45

Causas y consecuencias de la deficiencia de hierro sobre la salud humana

José. Boccio; María Concepción. Páez; Marcela. Zubillaga; Jimena. Salgueiro; Cinthia. Goldman; Domingo. Barrado; Margarita. Martínez Sarrasague; Ricardo. Weill 165

Factores de protección para la anemia ferropriva: estudio prospectivo en niños de bajo nivel socioeconómico

Macarena. Urrestarazu Devincenzi; Fernando A. Basile Colugnati; Dirce María. Sigulem 174

Impact of the hypocaloric diet using food substitutes on the body weight and biochemical profile

Mauro. Fisberg; Cecilia.Lacroix de Oliveira; Isa de Pádua Cintra; Gabriela. Losso; Milena. Baptista Bueno; Samantha. Ottani Rhein; Priscila. Maximino..... 402

Nutrición Infantil**Influencia del estado nutricional sobre la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas. Prevención y cura de diarreas infantiles**

María Esther. Río; Liliana Beatriz.Zago; Hugo. García; Luis. Ínter 287

Nutrición y Crecimiento**Crecimiento en talla de niños indígenas y no indígenas chilenos**

Patricia. Bustos; Mariana. Weitzman; Hugo. Amigo..... 190

Nutrición y Tercera Edad**Evaluación nutricional y estado antioxidante de un grupo de ancianos institucionalizados de Murcia (España)**

Javier. García-Alonso; María Jesús. Períago; María Luisa. Vidal-Guevara; María Carmen. Ramírez-Tortosa; Ángel. Gil; Gaspar. Ros..... 180

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; Liliana. León-Martínez; Rosaura León-Gálvez 93

Uso de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis* como extensores de una bebida láctea fermentada

Marisela. Granito; Lesma. Trujillo; Marisa. Guerra..... 229

Desarrollo de un producto de panificación apto para el adulto mayor a base de harina de trigo y harina de arroz

Maria José. Reyes Aguilar; Patricia de Palomo; Ricardo. Bressani.....	314
INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES	123,250,356,457
CARTAS AL EDITOR	246
NUEVOS LIBROS	247
NOTAS NECROLOGICAS	354
ÍNDICE GENERAL DEL VOLUMEN 54, 2004	464
ÍNDICE DE AUTORES	470
ÍNDICE DE MATERIAS	477

INDICE POR AUTORES DEL VOLUMEN 54-2004

A

Agostini, Lorena R.....	89
Aguilar de Plata, Cecilia.....	264
Alfaro, María de Jesús.....	223
Álvarez, Irama.....	223
Amigo, Hugo.....	190
Andrade, Margarita.....	33
Andrade-Neto, Manuel.....	349
Andrés-Lacueva, Cristina.....	79
Antunes Uchôa, Claudia María.....	395
Alarcón, AO.....	413
Alarcón- Corredor, OM.....	413
Arámbula-Villa, Gerónimo.....	216
Aranceta, Javier.....	9,14,65,87
Araujo Vizcarrondo, Consuelo.....	241
Arcila Lozano, Cynthia Cristina.....	100
Arias, María Laura.....	293,298,428,433
Arija Val, Victoria.....	72
Arredondo-Figueroa, J. L.....	235
Ascanio, Norelis.....	72
Atalah S, Eduardo.....	66,374
Avila, MA.....	50
Avila-Curiel, A.....	50

B

Babio, Nancy.....	72
Balcázar-Muñoz, Blanca R.....	274
Baptista Bueno, Milena.....	402
Barrado, Domingo.....	165
Barragán, L.....	50
Barrantes, Xinia.....	293
Barriga-Sosa, Irene de los Ángeles.....	235
Basabe Tuero, Beatriz.....	203
Basile Colugnati, Fernando A.....	174
Bazán-Arias, J.....	235
Belén, Camacho, Douglas Rafael.....	308
Bermúdez, Odilia I.....	363
Betancur Ancona, David.....	81
Blanco, Laura.....	433
Blanco-Metzler, Adriana.....	328
Boccio, José.....	165
Bou Rached, Lizet.....	72
Bressani, Ricardo.....	314

Brug, Johannes.....	14
Bullo, M.....	83
Burguesa, JL.....	413
Burguesa, M.....	413
Bustos, Patricia.....	190

C

Calvete, Juan J.....	349
Calvo, Melvin.....	428
Campos, Florisbela.....	25
Carazo, Melissa.....	428
Cardoso C.B.....	118
Carrasco N, Fernando.....	280
Carvalho Garbi Novaes, María Rita.....	257
Carvalho, E.B.....	118
Cassi, Lorena.....	328
Castillo Garzón, Manuel J.....	155
Castro-González, María Isabel.....	328
Cecilia. Castillo L.....	374
Cervantes Turrubiates, Leticia.....	24
Chaves, Carolina.....	293,428,433
Chávez, A.....	50
Chem, B.....	45
Chinchilla, Misael.....	428
Cintra, Isa de Pádua.....	402
Comunián-Carrasco, Gabriella.....	45
Cruz Naranjo, Martha Liliana.....	264

D

D' Jesús, I.....	413
De Bertorelli, Ligia O.....	438
De Caballero, Eira.....	66
De Palomo, Patricia.....	314
De Venanzi, Frank.....	438
Di Bernardo, ML.....	413
Díaz, Nora.....	33
Duarte, Geraldo.....	419

E

El Beitune, Patricia.....	419
El Khor, Sandra.....	223
Escobar Pérez, Margarita.....	24
Estevao Belchior, Silvia.....	337

F

Fajardo, María Angélica.....	337
Faria, Rozilaine A.P.G.....	349
Fernández_Ballart, Joan.....	72

Mora-Martínez, José M.....	274
Morán, María.....	346
Moreno Álvarez, Mario José.....	308
Moreno-Martínez, Ernesto.....	216
Morón Jiménez, María J.....	89
Morón, Cecilio.....	20,33
Mosquera Escudero, Mildrey.....	264
Muñoz-Navarro, Sergio.....	45
Miranda da Cruz, B.....	9

N

Navarro, M.P.....	112,444	1,444
Nevermann, Kart Schosinsky.....	444	
Nogo de la Cruz, Joy.....	44	
Nogueira, Antonio Alberto.....	419	
Nunes de Morais, Edson.....	419	419
Nus, Meritxell.....	137	

O

Ojeda de Rodríguez, Graciela.....	346
Ojeda, Anayté.....	328
Olivares, Sonia.....	33
Ortega Anta, Rosa María.....	87,203
Ortega Porcel, Francisco B.....	155
Ortega Soler, Carlos Rafael.....	17
Ottani Rhein, Samantha.....	402

P

Pacheco Aguirre, Jessé.....	81
Padilla, Fanny C.....	223,241,449
Padrón, Arelis.....	308
Páez, María Concepción.....	165
Peña, Jorge.....	346
Peña-Martí, Guiomar.....	45
Pérez Gil Romo, Sara Elena.....	24
Pérez Rodrigo, Carmen.....	9,52
Pérez-Gil, Fernando.....	328
Periago, María Jesús.....	180
Pessoa de Araújo, Burgos María Goretti.....	25
Pita Martín de Portela, María Luz.....	17
Port Lourenço, Ana Eliza.....	395
Pradilla Ferreira, Alberto.....	264

Q

Quintana Guzmán, Eugenia.....	444
Quintana, Silvana María.....	419

R

Railey, Dylana	293	
Ramírez de Fernández, M.....	413	
Ramírez García, Guadalupe.....	24	4
Ramírez Matheus, Alejandra O.....	438	
Ramírez-Tortosa, María Carmen.....	180	
Ramón, Adriana N.....	89	
Reyes Aguilar, Maria José.....	314	
Reyes S, Eliana.....	280	
Reyes A, Cecilia.....	374	4
Ribeiro Braga, Larissa.....	58	
Rimler S, Olga.....	280	
Rincón, Alicia Mariela.....	241,449	
Río, María Esther.....	287	
Ríos C, Francisca.....	280	
Risso, Susana.....	337	
Rivas Castellón, Rolando.....	349	
Robles Sánchez, Rosario Maribel.....	93	
Rodríguez - Rodríguez, Elena.....	380	
Rodríguez, Evelyn.....	303	
Romero, Rafael Cannet.....	93	
Ros, Gaspar.....	180	
Rostom de Mello, María Alice.....	58	
Ruíz Arregui, Liliana.....	24	
Ruiz Ruiz, Jonatan.....	155	
Ruiz Vadillo, Virginia.....	52	
Ruperto, Mar.....	137	

S

Salas-Salvado, J.....	83	
Salgueiro, Jimena.....	165	
Salvatierra, Marlon.....	298	
Sánchez-Muniz, Francisco J.....	137,380	
Seong-Ai, Kim.....	9	
Serra Majem, Lluís.....	40,44,72,87	
Serrano, José.....	36	36
Shamah, T.....	50	
Sigulem, Dirce María.....	174	
Silencio, José Luis.....	328	
Silva Pinto, Luciano.....	349	
Silva, Heliênia F.....	257	
Sinisterra, Odalis.....	66	
Soares L.M, Valente.....	118	
Solano Rodríguez, Liseti.....	196	
Silencio, José Luis.....	328	
Solomons, Noel W.....	363	
Sousa Cavada, Benildo.....	349	
Sulbarán de Ferrer; Betzabé.....	346	

T

Torre Medina-Mora, Pilar	24
Tovar, Juscelino	322
Trujillo, Lesma	229
Tur Marí, Joseph A.....	59
Torres-Moreno, M.....	83

U

Urrestarazu Devincenzi, Macarena	174
--	-----

V

Vannucchi, Hélio	419
Vega, Marta Faci	203
Velasco de Echeverri, María Teresa	264
Vernon-Carter, J.....	235
Vicario, Isabel M.....	149,209
Vidal-Guevara, María Luisa	180
Vio, Fernando	33
Vítolo, M.R.....	118
Vizuete, Aranzazu Aparicio.....	203

W

Weill, Ricardo	165
Weitzman, Mariana	190
Wind, Marianne	14
Winter, Luis	287

Z

Zacarías, Isabel	33
Zago, Liliana Beatriz.....	287
Zeledón, Zenen.....	303
Zubillaga, Marcela.....	165

INDICE POR MATERIAS DEL VOLUMEN 54-2004

A

ABSORCIÓN ATÓMICA.....	346
ACEITE DE OLIVA	59
ACEITES ESENCIALES.....	100
ÁCIDO FÓLICO.....	45
ÁCIDOS GRASOS	72, 137,328, 349
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	100
ADULTOS.....	314
AEROMONAS SP.....	433
AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....	380
ALBÚMINAS.....	81
ALCOHOL.....	25
ALERGIA.....	76
ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN.....	20
ALIMENTO MEDITERRANEO.....	76
ALIMENTOS.....	87, 303
ALMIDÓN.....	241,322
AMBIENTE.....	303
AMÉRICA LATINA	9,363
AMINOÁCIDOS.....	112
ANCIANOS.....	180
ANEMIA FERROPÉNICA.....	174
ANEMIA.....	17, 165
ANTECEDENTE FAMILIAR DE DIABETES MELLITUS TIPO 2	274
ANTIOXIDANTE PLASMÁTICOS.....	180
ANTIOXIDANTES DIETÉTICOS.....	180
ANTIOXIDANTES.....	59, 100, 149
ANTIRETROVIRAL.....	419
APOLIPOPROTEÍNAS.....	274
AROMA.....	100
ATEROSCLEROSIS.....	380
ATROPOMETRÍA.....	408
ATÚN ENLATADO	112

B

BACTERIAS.....	303
<i>BAUHINIA FORFICATA</i>	349
BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA	229
BEBIDAS CÍTRICAS	308

C

CALCIO.....	118,203
CALIDAD PROTEÍNICAS.....	112

CÁNCER	72
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	89
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	314
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	314
CARACTERÍSTICAS SENSORIALES	314
CARACTERIZACIÓN	241
CARBAMATOS	444
CARBOHIDRATOS GLICÉMICOS	36
CARBOHIDRATOS NO GLICÉMICOS	36
CARBOHIDRATOS	322
CAROTENOIDES	149
CARYODENDRON ORINOCENSE	223
CATEQUINAS	380
CEREALES	52
CHILE	374
COCINADO	112
COLESTEROL	413
COLESTEROLEMIA	257
COLIFORME FECALES	428
COLINESTERASA ERITROCÍTICA	444
COLINESTERASA SÉRICA	444
COMPOSICIÓN QUÍMICA	322
COMPUESTOS ANTINUTRICIONALES	36
CONGELACIÓN	438
CONTAMINACIÓN	303
CONTENIDO EN NUTRIENTES	112
CONTENIDO MINERAL	346
CONTROL DE PESO	58
COSTA RICA	322
CRYPTOSPORIDIUM SP	428
CYCLOSPORA SP	428

D

DAMNIFICADOS	24
DAR EL PECHO	25
DEFICIENCIA DE FOLATOS	45
DEFICIENCIA DE HIERRO	165
DÉFICIT DE CRECIMIENTO	190
DENSIDAD MINERAL ÓSEA	203
DENSIDAD ÓSEA	408
DEOXIPIRIDINOLINA	408
DESARROLLO GONADAL	235
DESASTRE	24
DESNUTRICIÓN INFANTIL	50
DESNUTRICIÓN	66, 287
DIABETES	83
DIARREA	287
DIETA MEDITERRÁNEA	44, 52, 59, 72, 87
DIGESTIÓN LACTOSA	76

E

EDUCACION NUTRICIONAL.....	9, 14, 33
EJERCICIO CONTINUO	58
EJERCICIO INTERMITENTE.....	58
EMBARAZO.....	17, 45, 419
ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	72, 83, 137, 380
ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES.....	264
ENFERMEDADES CRÓNICAS.....	72
ENSEÑANZA PRIMARIA.....	33
ENTEROCOCCUS SP.....	433
ESCHERICHIA COLI O157:H7.....	293
ESPAÑA.....	40, 44
ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL	180
ESTADO NUTRICIONAL	36
ESTADO ZULIA	346
ESTERILIZACIÓN.....	112
ESTRADIOL.....	408
ESTUDIO DE SEGUIMIENTO	174
ETNIA.....	190, 264
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	433
EVALUACIÓN NUTRICIONAL.....	180
EVALUACIÓN.....	33, 40
EXTENSOR.....	229

F

FACTORES DE ÉXITO.....	20
FACTORES DE RIESGO.....	174, 264
FIBRA.....	52
FIBRA DIETARIA.....	93
FIBRA DIETETICA.....	36, 322
FITOSTANÓIS.....	257
FITOSTERÓIS.....	257
FLAVONOIDES.....	89
FÓSFORO.....	203
FRIJOL NEGRO.....	36
FRITURA.....	59
FRUTAS.....	65,428
FRUTAS Y VERDURAS.....	14
FRUTOS SECOS.....	83, 137

G

GALLETAS CON FIBRA.....	93
GANANCIA DE PESO	66
GEOFAGIA.....	17
GLICEMIA POSTPRANDIAL.....	264
GLOBINAS.....	81
GLUTELINAS.....	81
GUÍAS ALIMENTARIAS.....	44

H

HÁBITOS ALIMENTICIOS.....	14
HACCP.....	72
HIERRO.....	165
HIPERLIPIDEMIA.....	413
HIPONATREMIA.....	155
HIV.....	419
HORTALIZAS.....	444

I

IMPEDANCIOMETRÍA.....	280
INDICADORES DE ESTADO DE NUTRICIÓN.....	50
ÍNDICE DE MASA CORPORAL.....	280
ÍNDICE GLUCÉMICO.....	52
ÍNDICE NUTRICIONAL.....	50
INFECCIÓN NOSOCOMIAL.....	303
INGESTA DIETÉTICA DE REFERENCIA.....	363
INOCUIDAD.....	72
INTERVENCIÓN NUTRICIA.....	24
INTERVENCIÓN NUTRICIONAL.....	66
INTOLERANCIA LACTOSA.....	76
ISÓTOPOS ESTABLES.....	9

L

LACTACIÓN.....	25
LACTANCIA MATERNA COMPLEMENTARIA.....	374
LACTANCIA MATERNA EXCLUSIVA.....	374
LÁCTEOS.....	203
LA TINOAMERICA.....	40
LECHE MATERNA.....	118
LESIÓN ENDOTELIAL.....	380
LIPEMIA POSPRANDIAL.....	264, 274
LÍPIDOS.....	137
LIPOPROTEÍNAS.....	137, 3280
LIPPIA.....	100
LISTERIA MONOCYTOGENES.....	293
LISTERIA SP.....	433

M

MACRONUTRIENTES.....	180
MADURACIÓN DE OVOCITOS.....	235
MAGNESIO.....	118
MAÍZ DULCE.....	438
MANIPULADOR DE ALIMENTOS.....	395
MASA GRASA CORPORAL.....	280
MATERIAL SUBUNGUEAL.....	395
MAZORCA.....	438
MEDIO ESCOLAR.....	14

MEJORES PRÁCTICAS.....	40
MESOAMÉRICA.....	363
MÉTODOS EDUCATIVOS.....	33
MÉXICO.....	328
MICRONUTRIENTES.....	180
MIEL.....	346
MINERALES.....	87
MODELO ALIMENTARIO.....	52
MODELO DE CONSUMO.....	65
MONOSTROMA UNDULATUM.....	337
MORTADELA.....	72

N

NARANJA.....	308
NIÑOS.....	66, 190, 287
NIVEL SOCIAL.....	190
NIXTAMALIZACIÓN.....	216
NUTRICIÓN NOENATAL.....	25
NUTRACÉUTICOS.....	328
NUTRICIÓN.....	9
NUTRICIÓN COMUNITARIA.....	9, 40
NUTRICIÓN HUMANA.....	349
NUTRICIÓN INFANTIL.....	174
NUTRICIÓN MATERNAL.....	25
ÑAME.....	322

O

OBESIDAD.....	33, 58, 83, 280, 402
OLEORRESINA SAPONIFICADA DE CHILE ROJO.....	235
OLIVO.....	59
OMEGA 3.....	328
ONCOLOGÍA.....	303
ORÉGANO.....	100
ORGANOFOSFORADOS.....	444
ORIENTACIÓN ALIMENTARIA.....	24
ORIENTACIÓN NUTRICIONAL.....	402
ORUJO DE UVA.....	93

P

PAGOFAGIA.....	17
PAN DE TRIGO/ARROZ.....	314
PARÁMETRO DE CALIDAD.....	216
PARÁSITO INTESTINAL.....	395
PARTICIPACIÓN COMUNITARIA.....	40
PASTEURIZACIÓN.....	308
PERFIL LIPÍDICO.....	380
PESCADO.....	72
PESCADO MARINOS.....	328
PESO CORPORAL.....	137

PESO PARA LA EDAD	50
PESO-EDAD	66
PHASEOLUS LUNATUS	81
PHASEOLUS VULGARIS	229
PICA	17
PIGMENTOS CAROTENOIDES	235
PLAGUICIDAS	444
POBLACIONES MICROBIANAS	337
POLISACÁRIDOS	52
POSTMENOPAUSIA	408
PREFERENCIAS ALIMENTARIAS	65
PREMATURIDAD	45
PREVENCIÓN PRIMARIA	174
PROBIÓTICOS EN DESNUTRICIÓN	287
PROBIÓTICOS	76, 293, 298
PRODUCTO PROTEICO	223
PRODUCTOS CÁRNICOS	72
PROGRAMAS	20
PROLAMINAS	81
PROMOCIÓN DE SALUD	9
PROPIEDADES FUNCIONALES	223
PROPIEDADES REOLÓGICAS	241
PROTEÍNA	36, 349
PROVITAMINA A	149

R

RAÍCES Y TUBÉRCULOS TROPICALES	322
RECOMENDACIONES DIETÉTICAS	44
RECOMENDACIONES NUTRICIONALES	363
RECURSO ALIMENTARIO	337
REPETIBILIDAD	216
REQUERIMIENTOS	363
RESIDUOS CÍTRICOS	308

S

SALMONELLA SPP	433
SALUD PÚBLICA	9
SEGURIDAD ALIMENTARIA	9
SENSORIALES	314
SOBREHIDRATACIÓN	155
SOBREPESO	402
SODIO	155
SOSTENIBILIDAD	20, 40
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	298
SUPLEMENTACIÓN ALIMENTARIA	66
SUPLEMENTO DE COBRE	413
SUSTITUCIÓN PARCIAL DE HARINAS	314
SUSTITUTOS ALIMENTARIOS	402

T

TALLA-EDAD	66
TÉ VERDE	380
TENDENCIAS NUTRICIONALES Y SOCIALES	44
TERCER TRIMESTRE	45
TERMONUCLEASA	298
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	112
TILAPIA	433
TIMOL	100
TIQUISQUE	322
TRATAMIENTOS TÉRMICOS	89
TRIGLICÉRIDOS	274, 413
TRUCHA ARCO IRIS	235

U

ULTRARESISTENCIA	155
-------------------------------	-----

V

VALOR NUTRITIVO	322
VEGETALES	428,444
VENEZUELA	45
VERDURAS	65
VIGILANCIA NUTRICIA	24
VIGNA SINENSIS	229
VITAMINA A	419
VITAMINAS	87

Y

YOGURT	76, 293, 298
YUCA	322

Z

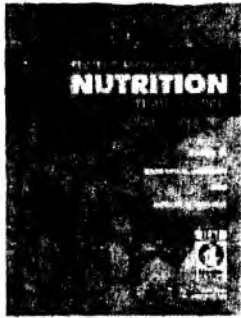
ZEA MAYS	438
ZINC SÉRICO	413

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

MEETING SPECIAL PURCHASE



Present Knowledge in Nutrition

8th Edition (retail \$89.00) in English or Spanish

for **\$48.95**

That's a 45% savings off the original price!

Order by December 15, 2004 to take advantage of this discount.

The significantly expanded eighth edition of this classic nutrition text presents must-have information for nutrition scientists everywhere. Researchers, dietitians, clinical nutritionists, students, and other professionals have come to rely on *Present Knowledge in Nutrition* for easily accessible, dependable, up-to-date reviews on energy needs, macronutrient and micronutrient requirements, nutrition-disease correlations, nutritional needs throughout the life cycle, food composition, and other topics. Each of the thoroughly referenced 65 chapters, grouped into two sections, reviews what is currently known about each subject and provides a gateway to supporting studies and more information. Inclusion of Dietary Reference Intake values adds to the book's timeliness. *Present Knowledge in Nutrition* is also a popular teaching tool in advanced undergraduate and graduate nutrition classes, including clinical nutrition.

The eighth edition of Present Knowledge in Nutrition is an indispensable, important text, and is extremely useful and practical addition to the library of health professionals.
—J.F. Chavez, *Latin American Archives of Nutrition*

Please send me _____ copies of *Present Knowledge in Nutrition 8th Edition* in **Spanish** for \$48.95 each plus \$35 shipping and handling*

Please send me _____ copies of *Present Knowledge in Nutrition 8th Edition* in **English** for \$48.95 each plus \$35 shipping and handling*

Name _____

Title _____ Department _____

Institution/Company _____

Street Address _____

City, State, Country Code _____

Phone _____ Fax _____

E-mail _____

Payment AMEX Visa MasterCard Check or Money Order enclosed

Credit Card Number _____ Expiration Date _____

Signature _____

*Shipping for bulk orders is calculated per order

Order by phone: 202-659-0074 x159; **Fax:** 202-659-3859; **E-mail:** ilsipress@ilsis.org;
or by Mail: ILSI Press, One Thomas Circle NW, Ninth Floor, Washington DC 20005-5802

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	Juscelino 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° 4, Diciembre 2004

Contenido

	Páginas
ARTICULOS GENERALES	
Armonización de las Recomendaciones Nutricionales para Mesoamérica: ¿Unificación regional o individualización nacional? Noel W. Solomons, Martha Kaufer-Horwitz and Odilia I. Bermúdez	363
Efectividad de un programa nacional de fomento de la lactancia materna en Chile 1993-2002 Eduardo Atalah S., Cecilia Castillo L., Cecilia Reyes A.	374
El té verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares? Tania T. Hernández Figueroa, Elena Rodríguez-Rodríguez, Francisco J. Sánchez-Muniz	380
Hospital food handlers in Niterói, RJ, Brazil: intestinal parasitism Ana Eliza Port Lourenço, Claudia Maria Antunes Uchoa. Otilio Machado Pereira Bastos	395
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Nutrición Humana	
Impact of the hypocaloric diet using food substitutes on the body weight and biochemical profile Mauro Fisberg, Cecilia Lacroix de Oliveira, Isa de Pádua Cintra, Gabriela Losso, Milena Baptista Bueno, Samantha Ottani Rhein, Priscila Maximino	402
Nutrición Clínica	
Excreción urinaria de deoxipiridinolina y su relación con la densidad mineral ósea, el estradiol sérico y los años de postmenopausia en mujeres mexicanas Rosa Olivia Méndez Estrada y C. Jane Wyatt	408
Efecto de la suplementación oral con cobre en el perfil lipídico de pacientes venezolanos hiperlipémicos Alarcón-Corredor OM, Guerrero Y, Ramírez de Fernández M, D'Jesus I, Burguera M, Burguera JL, Di Bernardo ML, García MY y Alarcón AO	413
Bioquímica Nutricional	
Níveis plasmáticos de vitamina A e os resultados obstétricos e perinatais em gestantes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) Patrícia El Beitune, Geraldo Duarte, Hélio Vannucchi, Silvana Maria Quintana, Ernesto Antonio Figueiró-Filho, Edson Nunes de Moraes, Antonio Alberto Nogueira	419
Microbiología de Alimentos	
Prevalencia de <i>Cyclospora</i> sp., <i>Cryptosporidium</i> sp., microsporidos y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica Melvin Calvo, Melissa Carazo, María Laura Arias, Carolina Chaves, Rafael Monge y Misael Chinchilla	428
Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (<i>Oreochromis niloticus</i>) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica Graciela Morales, Laura Blanco, María Laura Arias y Carolina Chaves	433
Ciencia de Alimentos	
Adaptabilidad de híbridos de maíz dulce a la congelación en mazorcas Alejandra O. Ramírez Matheus, Norelkys Maribel Martínez, Ligia O. de Bertorelli, Frank De Venanzi	438
Detección de plaguicidas en vegetales de Costa Rica mediante la inhibición de colinesterasas humanas Karl Schosinsky Nevermann y Eugenia Quintana Guzmán	444
LatinFoods. Composición de Alimentos	
Physicochemical properties of Venezuelan breadfruit (<i>Artocarpus altilis</i>) starch Alicia Mariela Rincón, Fanny C. Padilla	449
INFORMACION PARA LOS AUTORES	457
INDICE GENERAL DEL VOLUMEN 54, 2004	464
INDICE DE AUTORES	470
INDICE DE MATERIAS	477