

00528
49



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INFLUENCIA DE LA VITAMINA A Y DEL HIERRO EN LA
PRUEBA BIOLOGICA DE LA CALIDAD DE LA PROTEINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
KARINA NORIKO HIRATA TSUTSUMI



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

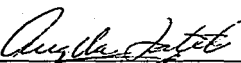
Jurado Asignado:

Presidente. Prof. Angela Sotelo López
Vocal. Prof. Ernestina Cervera Flores
Secretario. Prof. Lucía Gabriela Bascuñan Termini
1er. Suplente. Prof. Lucía Cornejo Barrera
2do. Suplente. Prof. Araceli Patricia Peña Alvarez

Sitio donde se desarrolló el tema: Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Química

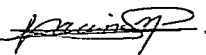
Conjunto E. Laboratorio 111.
Departamento de Farmacia.



M. en C. Angela Sotelo López
Asesor



M. en C. Rosa María Argote Espinosa
Supervisor Técnico



Karina Noriko Hirata Tsutsumi
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de crecer y desarrollarme profesional y personalmente.

A la Maestra Angela Sotelo, por brindarme su confianza para realizar un trabajo de investigación, por compartir sus conocimientos y por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A Rosa María Argote por su cariño, consejos, paciencia y la valiosa ayuda que me brindó a lo largo de mi estancia.

A la Maestra Inés Fuentes y a Leobardo Reyes, por permitirme trabajar con ustedes, por todas sus enseñanzas y su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al profesor Miguel Hernández y a la Maestra Irene Montalvo, del Departamento de Nutrición del Centro Médico siglo XXI, por el apoyo en la medición del hierro, y por la donación de estándares de retinol, respectivamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo económico otorgado en la realización del proyecto

Al Profesor Bernardo Lucas por su aportación en conocimientos de toxicología, paquetes estadísticos y todo su apoyo.

A Leticia Gil, Iliana, Argelia, Sandra Vidal, Rosita y Carlos por su ayuda tanto en el laboratorio como en el bioterio y por sus pláticas tan amenas durante mi estancia.

A Gaby, Toño y Fer por su ayuda, sus consejos, su apoyo incondicional y por brindarme su sincera amistad

A la Sra. Vicky por ayudarnos, querernos, consentirnos y por todos sus detalles con nosotros.

A todos mis compañeros del laboratorio 111, Gaby, Toño, Fercita, Daniela, Carlos, Celina, Semei, Illi, Arge, Fidelito, Sandra, Milet, Claudia, Vanesa, Fer Cardoso, Tibisai, Poncho, Verito, Susana, Héctor, Chela, Chío, con los que pasé momentos muy agradables.

A

DEDICATORIAS

A mis padres, Toyomi y Tokujiro, por estar siempre conmigo, por preocuparse por mí, por apoyarme... y simplemente por ser unos excelentes padres.

A mis hermanos, Kyoko, Hirokazu y Tomomi por ser las personas más cercanas a mí y por ser muy buenos hermanos

A Toyomi, Minako, Isao, Hiromi, Gaby, Toño, Fercita, Ale Luna, Daniela, Joanna, Jorge Carretero, Bárbara, Valeria, Raúl, por ser muy buenas personas, y por ser los mejores amigos que he conocido.

A todos mis amigos Miguel Abe, Haru, Miguel Murakami, Kike, Akio, Keiyl, Yochis, Karen, Keka, Hide Matsubara, Hide Nakasone, Saori, Taka Kishi, Arturo, Rodrigo Arriola, Pablo, Laura T, Celina, Darío, Chío, Berenice, Goyo, Jesús M, Jessica, Yair, Cinthya, Vero, Sandra Vidal, Tibi, Claudia, simplemente por ser personas que estimo.

ÍNDICE

Tema	pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	
General	3
Específicos	3
III. Antecedentes	
1. Desnutrición energético –proteínica	4
2. Hidratos de Carbono	5
2.1 Proceso de digestión y absorción de hidratos de carbono	6
3. Vitamina A	8
3.1 Funciones de la vitamina A	10
3.2 Requerimientos de la vitamina A	10
3.3 Deficiencia de la vitamina A	10
3.4 Toxicidad de la vitamina A	11
3.5 Métodos de análisis de la vitamina A	12
4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	13
4.1 Parámetros cromatográficos	14
4.2 Elementos básicos de cromatografía	15
4.3 Cromatografía de reparto	19
4.4 Validación de métodos analíticos	22
5. Hierro	24
5.1 Deficiencia de hierro	26
5.2 Toxicidad del hierro	27
6. Efecto sinérgico entre vitamina A y hierro	29
7. Evaluación Biológica	30
7.1 Relación de Eficiencia Proteínica (REP)	31

VI. Metodología	
1. Diagrama general de la investigación	33
2. Descripción de la metodología	35
2.1 Bioensayo	35
2.1.1 Preparación del homogenizado de la fracción del borde en cepillo del intestino	38
2.3 Determinación de actividad enzimática de las disacaridasas	
2.3.1 Ensayo enzimático de las disacaridasas	40
2.3.2 Determinación de glucosa	45
2.3.3 Determinación de proteína	48
2.3.4 Análisis estadístico	51
2.4 Determinación de hemoglobina	52
2.5 Determinación de hierro en hígado y bazo	
2.5.1 Método de absorción atómica	53
2.5.2 Método colorimétrico	54
2.6 Determinación de retinol	
2.6.1 Determinación de retinol en plasma	57
2.6.2 Validación	59
V. Resultados y discusión	61
VI. Conclusiones	80
VII. Bibliografía	81

I. INTRODUCCIÓN

La desnutrición energético-proteínica es un problema de gran magnitud en el mundo. En 1998, el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia^{1,2} estimó que en todo el mundo había 226 millones de niños con desnutrición energético-proteínica (evaluado por la disminución de estatura esperada para su edad) 67 millones con desnutrición energético-proteínica aguda (peso inferior a la estatura esperada) y 183 millones con un peso menor para su edad, lo cuál indica que 4 de cada 10 niños menores de cinco años presentaban alguna alteración relacionada con la desnutrición.

La desnutrición es consecuencia de las enfermedades infecciosas principalmente, y una ingestión alimentaria inadecuada, pero también está asociada a muchos factores interrelacionados entre sí como son los de índole social, político, económico, ambiental, psicológico y cultural³.

Cuando un niño tiene un problema de desnutrición, se ha visto que presenta una serie de características fisiopatológicas importantes, dentro de los cuales es relevante mencionar el problema que se presenta en el tracto gastrointestinal, donde se reduce la cantidad de ácido clorhídrico que se produce y también se da una disminución, acortamiento y aplastamiento de las vellosidades del borde en cepillo⁴, provocando alteraciones en los procesos de digestión y absorción de nutrientes como la lactosa, por lo cual el niño no puede obtener los nutrimentos a partir de su alimento principal, la leche.

En México también es muy común este tipo de desnutrición, ya que la dieta de los niños se basa fundamentalmente en atoles, es decir, alimentos ricos en carbohidratos, pero deficientes en lípidos, proteínas y en micronutrimentos.

En este estudio se pretendió imitar esta situación nutricional en ratas para poder determinar si el aprovechamiento de la proteína es igual en animales desnutridos que en animales desnutridos con una dieta suplementada con vitamina A y hierro, que se sabe que son los micronutrientes más escasos en la población mundial. En trabajos anteriores se ha visto que hay una interacción entre la vitamina A y el hierro en el metabolismo, en donde la carencia de esta vitamina puede causar un tipo de anemia caracterizado por presentar bajos niveles de hierro sérico⁵, ya que la vitamina A ayuda a la absorción de este mineral⁶.

En este trabajo se realizó un bioensayo manejando 3 lotes de 10 ratas cada uno, teniendo un lote control, uno desnutrido y uno desnutrido pero suplementado con vitamina A y hierro, para conocer si los animales alimentados con una dieta de baja cantidad proteínica se ven afectados por la presencia de estos dos micronutrientes

II. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- **Averiguar si la Prueba Biológica de Calidad Proteínica (REP) se ve afectada cuando se reduce el porcentaje de proteína y calorías en la dieta, pero se adiciona con vitamina A y hierro, así como ver si se afecta la actividad de las disacaridasas.**

2.2 ESPECÍFICOS

- **Determinar la relación de eficiencia proteínica de cada dieta.**
- **Medir la concentración de hemoglobina en las ratas de los diferentes grupos experimentales.**
- **Estandarizar la metodología para realizar las determinaciones de hierro en hígado y bazo.**
- **Realizar la determinación de la actividad enzimática de las disacaridasas en la mucosa intestinal.**
- **Implementar la metodología para realizar las determinaciones de retinol en sangre.**

III. ANTECEDENTES

1. Desnutrición energético-proteínica

La desnutrición es un estado patológico, inespecífico, sistémico y potencialmente reversible, que se origina como resultado de la deficiente incorporación de los nutrimentos a las células del organismo, y se presenta con diversos grados de intensidad y varias manifestaciones clínicas de acuerdo con factores ecológicos. La incorporación deficiente de nutrimentos se debe al bajo consumo de alimentos (desnutrición primaria), a un aumento de los requerimientos, a un gasto excesivo o a la combinación de los tres factores. Esta situación provoca una pérdida de las reservas del organismo, incrementa la susceptibilidad a las infecciones e instala el ciclo desnutrición-infección-desnutrición (desnutrición secundaria)³.

La desnutrición provoca cambios en el metabolismo de los nutrimentos y entre ellos el metabolismo energético, así como en la composición corporal, por lo que se ven alterados los órganos y sistemas, y consecuentemente el niño desnutrido es más susceptible a las infecciones, este sinergismo desnutrición-infección contribuye, aproximadamente en el 50% de los casos, a la disminución de la expresión del potencial genético del crecimiento y desarrollo físico.

Entre los efectos de una infección sobre el estado nutricional se pueden señalar las siguientes⁷.

- a) Disminución en el consumo de alimentos y cambios dietéticos por falta de apetito, lo cual contribuye a incrementar la acción adversa de la infección en el estado de nutrición.

- b) Mala absorción o disminución de la absorción de nutrimentos. Se sabe que los individuos que presentan infecciones intestinales recurrentes, desarrollan cambios morfológicos en la mucosa intestinal que son responsables de la mala absorción de los macronutrimentos y de la secreción de algunas enzimas que se utilizan durante el proceso de absorción de los nutrimentos.
- c) En respuesta fisiológica a la infección se modifica el metabolismo debido a la fiebre, el sudor y a la respuesta inmune. En cuanto al balance proteínico éste puede ser afectado de dos maneras: 1) Se incrementa el uso de los aminoácidos en el plasma para la síntesis de las proteínas asociadas con la respuesta inmune, y 2) Se aumenta el catabolismo de los aminoácidos en el hígado para la gluconeogénesis. Ambas alteraciones provocan un balance negativo de nitrógeno mucho mayor que el producido por la sola disminución en el consumo de alimentos.

2. Hidratos de Carbono

Los hidratos de carbono constituyen la mayor parte de la dieta: entre un 50 – 70% del total de las calorías consumidas. Dentro de los carbohidratos más consumidos se encuentran el almidón, azúcares simples, polímeros complejos conocidos como fibra dietética y componentes menores, además un gran número de hidratos de carbono son añadidos a la dieta como jarabe de maíz, jarabe de fructosa, almidones modificados, gomas, mucilagos, y otros productos procesados que son añadidos para modificar la textura, palatabilidad, vida de anaquel, color, viscosidad y sabor.

Los hidratos de carbono son ingeridos básicamente en: vegetales, frutas y granos crudos y procesados como hidratos de carbono purificados adicionados a los alimentos y los que

se encuentran disueltos en bebidas. El consumo de hidratos de carbono es la forma rápida y barata de obtener energía

2.1 Proceso de digestión y absorción de hidratos de carbono.

La ingestión, digestión, absorción y transporte de los hidratos de carbono es un proceso altamente regulado e interactivo. El efecto visual y olfativo de los alimentos antes de su ingestión estimulan la liberación de insulina. La insulina prepara al intestino para el transporte de nutrimentos reclutando transportadores de glucosa inactivos, llevándolos a la superficie celular donde son activos.

La presencia del alimento en el estómago libera hormonas que desaceleran la ingesta y activan el proceso intestinal que aceleran la absorción. Al llegar el alimento al intestino se activan los receptores, provocando la liberación de hormonas del intestino, las cuales a su vez liberan insulina.

El primer paso de la digestión de los hidratos de carbono es la masticación del alimento, durante esta etapa los gránulos de almidón son expuestos, aumenta el área superficial debido a la reducción del tamaño de la partícula. El alimento en la boca se mezcla con la α -amilasa salivar que comienza a hidrolizar el almidón inmediatamente. Esta hidrólisis se detiene en el estómago debido al cambio de pH y la hidrólisis se reanuda en el duodeno en donde se secreta la α -amilasa pancreática. La acción acumulativa de las dos amilasas produce maltosa y maltotriosa a partir de amilosa y la amilopectina, de la cuál también se obtienen dextrinas límite.

La digestión de la maltosa, maltotriosa, dextrinas límite y la mayoría de los disacáridos incluidos los dos disacáridos más consumidos en la dieta humana, es decir, la sacarosa y

la lactosa, son hidrolizados a los respectivos monosacáridos que las constituyen por las enzimas del borde en cepillo del intestino delgado, que son las disacaridasas⁸.

La mucosa intestinal presenta un gran número de pliegues conniventes (o pliegues de Kercking) que se extienden circularmente sobre toda la superficie interna del intestino delgado, siendo más pronunciados en duodeno y yeyuno⁹.

Toda la superficie del intestino delgado, desde la desembocadura del colédoco hasta la válvula ileocecal, está cubierto por vellosidades que aumentan la superficie total de absorción. Cada vellosidad se encuentra rodeada de varias invaginaciones (alrededor de ocho), llamadas criptas⁸.

Las células del epitelio intestinal (enterocitos) se caracterizan por un borde en cepillo formado por microvellosidades que nacen de cada célula, de esta forma aumentan más la superficie de absorción, dichas células contienen ancladas enzimas que completan la hidrólisis de los hidratos de carbono¹⁰.

La absorción de los monosacáridos inicia en el extremo distal del duodeno y generalmente es completada en los primeros 50-100cm del yeyuno. Se conocen al menos dos tipos de sistemas de transporte que catalizan la captación de monosacáridos desde la luz intestinal a la célula¹¹:

- a) Un sistema de cotransporte Na^+ -monosacárido con elevada especificidad para D-glucosa y D-galactosa que cataliza el transporte activo de azúcares.
- b) Un sistema de transporte de monosacáridos con especificidad para la D-fructosa que es del tipo de difusión facilitada que es dependiente del Na^+ .

La mayoría de los mamíferos tienen cinco disacaridasas (maltasa, sacarasa, isomaltasa, trehalasa, lactasa)¹², unidas al borde en cepillo del intestino delgado, las cuales comparten varias características a excepción de la trehalasa, entre las cuales se encuentra: el peso molecular de 200,000 a 300,000 Da, una porción hidrofóbica intracelular que actúa como anclaje a la membrana del borde en cepillo, dos sitios catalíticos independientes, cada uno en un dominio diferente y una alta glicosilación.

Debido a que las disacaridasas son de recambio acelerado, son lo que primero se afectan cuando se presenta la desnutrición proteínica. La unión de las disacaridasas a la membrana es vulnerable al ataque de proteasas pancreáticas, a pesar del constante recambio, por lo que son inicialmente removidas de la superficie celular y posteriormente degradadas en el lumen intestinal⁸.

La distribución de las disacaridasas a lo largo del intestino en el hombre, se concentra principalmente en el yeyuno, donde la actividad de la lactasa, sacarasa, maltasa, isomaltasa y trehalasa es alta, va disminuyendo en el ileon y es casi nula en el duodeno¹². De esta manera el yeyuno es el sitio de mayor absorción de los disacáridos en el hombre, cuyo patrón de distribución es similar al de la rata.

3. Vitamina A

Pertenece al grupo de las vitaminas oleosolubles. La forma activa de la vitamina A sobre la visión es el 11-cis retinal y la que tiene usos terapéuticos es la forma ácido 13-cis retinóico, la forma en la que se almacena principalmente es como palmitato de retinol. En un sentido nutricional la familia de la vitamina A incluye todos los compuestos naturales

que tengan la actividad biológica del retinol. Los carotenoides están incluidos dentro de la familia de la vitamina A debido a que son nutricionalmente activos⁸.

La vitamina A dentro del organismo proviene de dos fuentes, de la vitamina A preformada contenida en alimentos de origen animal y del β -caroteno y otros carotenoides provitamina A contenidos en fuentes de origen vegetal. Ambos son liberados de la proteína en el estómago y al igual que todos los demás lípidos son absorbidos por la pared del intestino delgado y se transforman en parte de los quilomicrones que ingresan al torrente sanguíneo. Desde aquí son tomados por el hígado, donde son almacenados como retinil éster principalmente en células especiales llamadas células estrelladas. Para ser transportado a otras partes del organismo, el retinol se une a su propia proteína, la proteína ligante del retinol (RBP por sus siglas en inglés) y a otra proteína llamada transtiretina (TTR por sus siglas en inglés). En la membrana celular, el retinol es tomado por receptores (receptores RBP). Dentro de las cuales hay proteínas celulares que se ligan con los retinoides (conocidas como CRBP por sus siglas en inglés) que dirigen los retinoides hacia enzimas específicas y, más importante aún, hacia el núcleo de la célula.

Recientemente se ha descubierto que en el núcleo de las células hay dos conjuntos de tres receptores nucleares (conocidos como RAR y RXR por sus siglas en inglés). Estos receptores nucleares son activados por una forma ácida del retinol como el ácido retinóico (RA por sus siglas en inglés). En las células de los órganos y tejidos de todo el organismo el RA es la forma activa de la vitamina A. Se ha demostrado que los receptores nucleares RAR RXR activan a numerosos genes. Estos receptores actúan como hormonas, tales como los esteroides y las hormonas tiroideas, con las cuales están vinculadas estrechamente. Es a través de este mecanismo que la vitamina A ejerce sus funciones, con la única excepción de la visión. En las células de la retina (conos y

bastoncillos) responsables de la visión, la forma funcional de la vitamina A no es el ácido retinóico (RA) sino el 11-cis retinal¹³.

3.1 Funciones de la vitamina A en el organismo.

- Visión (noche, día , color)
- Integridad de las células epiteliales contra las infecciones
- Respuesta inmunológica
- Hematopoyesis
- Crecimiento del esqueleto
- Fertilidad (femenina y masculina)
- Embriogénesis

3.2 Requerimientos de la vitamina A

Equivalentes retinol (ER) diarios (1ER = 1µg de retinol)

Niño	1 – 6 años	400ER
	Mujer	500ER
Adulto	Hombre	600ER
Embarazo		600ER

3.3 Deficiencia de vitamina A

Esta deficiencia aparece ampliamente difundida en los países en vías de desarrollo, considerándose un problema importante de salud pública, ya que afecta primordialmente a los niños, siendo causal de daños oculares y ceguera, y del incremento de tasas de morbilidad por diarrea severa, sarampión y otras infecciones aún en aquellos niños que muestran un estado nutricional aparentemente adecuado, sin presentar signos clínicos

específicos de deficiencia, esto es debido a que la vitamina A juega un papel importante en la integridad de los epitelios y en el mantenimiento de una función inmunológica normal, la carencia de esta vitamina se asocia con alteraciones en la función de los linfocitos T, el deterioro del recambio de epitelio en las mucosas y un aumento en la adhesión de las bacterias al epitelio¹³⁻¹⁵.

Etapas de la deficiencia de vitamina A

Subclínica

- Reservas en disminución
- Nivel sérico en disminución
- Metaplasia

Clínica

- Xeroftalmia
 1. Que no produce ceguera
 2. Que produce ceguera

La tasa de morbilidad se puede reducir mediante la suplementación con este nutriente.

3.4 Toxicidad de Vitamina A

A pesar de que la literatura contiene aproximadamente 200 reportes de intoxicación de vitamina A en el hombre, la intoxicación raramente ocurre por la ingestión natural de los alimentos, a excepción de los obtenidos por el consumo de hígado de osos polares por los exploradores, o por la ingestión de hígado de pescados que tienen la capacidad de almacenar una alta cantidad de vitamina A. La causa principal de la toxicidad de vitamina A es el prolongado consumo de suplementos vitamínicos, frecuentemente iniciados por razones dermatológicas. La toxicidad aguda en el adulto requiere una dosis dentro de un rango entre 2-5 millones de UI o mayor. En los infantes una dosis menor o igual a 75,000 a

300,000 UI puede presentar signos de toxicidad aguda generalmente causada accidentalmente por una sobredosis o una suplementación incorrecta. La toxicidad crónica desarrollada en pocos meses es comúnmente encontrada en infantes y niños. Los síntomas de la toxicidad aguda en el hombre son: dolores de cabeza severos centrados en la frente y ojos, vértigo, somnolencia, náusea con vómito seguido de enrojecimiento e hinchazón de la piel con descamación. Los síntomas de la toxicidad crónica en el hombre son anorexia, dolores de cabeza, visión borrosa, dolor muscular después de hacer ejercicio, pérdida de cabello, erupciones maculoeritematos en los hombros y espalda, y una general sequedad y descamación de la piel, labios resecos y partidos, sangre de la nariz¹⁶.

3.5 Métodos de análisis de la vitamina A

Debido a su sistema de dobles enlaces conjugados, la vitamina A absorbe muy bien la luz ultravioleta. La longitud de onda en donde se tiene la máxima absorción y el coeficiente de extinción molar en etanol, respectivamente es 325nm y 52,480 para all-trans retinol⁸. Estas características espectroscópicas son utilizadas principalmente en la cuantificación de la vitamina A y carotenoides.

Así mismo los sistemas cromatográficos también son viables en la separación de vitamina A y carotenoides. El proceso más frecuentemente utilizado es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC)⁸. En los ensayos de niveles de vitamina A en humanos se usan una gran variedad de métodos bioquímicos, fisiológicos, histológicos y clínicos.

4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía en general, es un método utilizado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual estos se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, líquido retenido en un sólido o un gel empacado en una columna extendida como una capa o distribuida en forma de una película fina. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida. La separación se efectúa mediante una gran variedad de técnicas y las diferencias moleculares en las que se fundamenta son muy diversas: carga, peso molecular, polaridad del enlace, potencial redox, pka y estructura de los isómeros o quiralidad¹⁷.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no está limitada en aplicación por la volatilidad de sus componentes o por su estabilidad térmica, lo cual lo hace un buen método de análisis para materiales poliméricos, iónicos, polares, térmicamente inestables, una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Una ventaja más es que los detectores utilizados en el HPLC son no destructivos, por lo que facilita la recuperación de las muestras dando la oportunidad de estudios espectroanalíticos posteriores.

En resumen, la cromatografía líquida moderna tiene ventajas como por ejemplo: las columnas se pueden volver a utilizar, el muestreo puede ser automatizado, la detección y cuantificación se puede llevar a cabo por el uso de detectores de flujo continuo, estos factores ayudan a mejorar la exactitud y precisión del análisis¹⁸.

Existen cuatro tipos de cromatografías en las que la fase móvil es un líquido. *Cromatografía de exclusión*, que se utiliza para solutos con masas moleculares superiores a 10,000. *Cromatografía de intercambio iónico* para especies iónicas de masa molecular más

pequeña. *Cromatografía de reparto* se aplica para las especies poco polares pero no iónicas, además este procedimiento se utiliza muchas veces para la separación de los integrantes de una serie homóloga. *Cromatografía de adsorción* se elige con frecuencia para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos como hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos¹⁹.

4.1 Parámetros cromatográficos²⁰

Tiempo de retención (t_r): Es el tiempo que un soluto permanece en la columna. Se mide desde el tiempo de la inyección hasta la elusión del máximo pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constantes. Auxiliar en la identificación de los solutos.

Tiempo muerto (t_0): Es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Representa el espacio vacío de la columna.

Tiempo de retención ajustado (t'_r): Mide el tiempo que el componente permanece en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0$$

Ancho del pico: Ancho del pico a la base (W_b) Es la proporción de la línea base intersectada por las tangentes al pico. Tradicionalmente utilizado en el cálculo de la eficacia del sistema. $W_{1/2}$ es el ancho a la mitad del pico, que es una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos).

Número de platos teóricos (N): Cada plato teórico representa un equilibrio de distribución del soluto entre las fases. El número de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna.

$$N = 16(t_r/W_b)^2 = 5.545 (t_r/W_{1/2})^2 = 2\pi [t_r/(Area/Altura)]^2$$

Altura equivalente a un plato teórico (H, AEPT, HETP) Es la medida inversa de la eficiencia del sistema: $H = L/N$; donde L es la longitud de la columna.

Factor de capacidad (k') Se define como la razón de la cantidad de soluto en la fase estacionaria entre la cantidad de fase móvil al equilibrio.

$$k' = t'_r / t_0$$

Selectividad (α): Mide las diferencias relativas entre la interacción de dos solutos con la fase estacionaria. Un valor mayor de α significa una columna más selectiva y mejor separación entre solutos.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = t'_{r2} / t'_{r1} \geq 1$$

Resolución (Rs): Es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos solutos.

$$Rs = N^{1/2} / 4 (\alpha - 1 / \alpha) (k'_2 / 1 + k'_2)$$

4.2 Elementos básicos de cromatografía

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 2 y 10 μm , que, por otra parte son comunes en la moderna cromatografía de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kg-fuerza por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía.

Es necesario que se eliminen los gases disueltos en los disolventes que se utilicen en el HPLC, ya que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamiento de banda y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector, se pueden utilizar degasificadores o tratar los disolventes, filtrarlos (filtro *millipore*), antes de introducirlos al recipiente.

Elución isocrática: Es una separación que utiliza un solo disolvente.

Elución con gradiente: En este caso se utilizan dos o tres sistemas disolventes con una polaridad significativamente diferentes. Una vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas. Con frecuencia la eficacia de la separación se aumenta notablemente con este tipo de elución.

Sistemas de bombeo.

Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen (1) la generación de presiones por encima de 6000psi, (2) un flujo libre de pulsaciones, (3) un intervalo de caudales de 0.1 a 10ml/min, (4) el control y la reproducibilidad del caudal mejor del 0.5 por 100 relativo y (5) componentes resistentes a la corrosión.

Sistemas de inyección de muestra.

A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se acentúa por el ensanchamiento de la banda que acompaña a la sobre carga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños de unas pocas décimas de mililitro a tal vez 500 μ l. El medio más simple implicaba la inyección con una jeringa a través de un elastómero. En las inyecciones a flujo detenido, el flujo del

disolvente se detiene momentáneamente, se retira el conector de la cabeza de la columna y la muestra se inyecta directamente en el relleno de la cabeza de la columna, después se retira el accesorio y se vuelve a presurizar. Desafortunadamente la reproducibilidad de la inyección con jeringa rara vez es menor de un 2 o un 3% y con frecuencia es considerablemente peor.

El método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza bucles de muestra. Estos dispositivos son generalmente una parte integrada del equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500 μ l.

Columnas cromatográficas

Columnas analíticas. La mayoría tienen una longitud entre 10 y 30cm por lo común son rectas y se pueden alargar. El diámetro interno es a menudo de 4 a 10mm y los tamaños de partícula de los rellenos más comunes son 5 o 10 μ m. Se han comenzado a fabricar columnas de alta eficacia que pueden tener diámetros que oscilan entre 1 y 4.6mm y se rellenan con partículas de tamaño de 3 o 5 μ m. Estas columnas tienen hasta 100000 platos/metro y presentan la ventaja de la rapidez y del mínimo consumo de disolvente.

Precolumnas: sirven para aumentar la vida de la columna analítica, ésta elimina no solo la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria.

Columnas termostalizadas, con un control de la temperatura de estas columnas en unas pocas de décimas de grados centígrados, se pueden obtener mejores cromatogramas.

Rellenos de las columnas.

Los típicos rellenos de partículas porosas están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 μm y con la menor dispersión posible con respecto a un tamaño determinado. Las partículas son de sílica, alúmina, de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico, aunque la sílice es el material de relleno más común en cromatografía de líquidos.

Detectores.

Existen dos tipos básicos de detectores, los que se basan en la medida de una propiedad de la disolución que responden a una propiedad del efuente, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad que se modifica por la presencia de los analitos, y los detectores basados en una propiedad del soluto que responden a alguna de las propiedades de este, como la absorbancia en el UV, fluorescencia, o corriente límite.

Los detectores de absorbancia son los más usados en HPLC, muchos de estos detectores son dispositivos de doble haz, en los que uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. Para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados. El cromatograma consiste en una representación del logaritmo del cociente de las dos señales detectadas en función del tiempo. También se utilizan sistemas de un solo haz. En este caso las medidas de intensidad del disolvente se almacenan en la memoria de un ordenador y al final se recuperan para el cálculo de la absorbancia.

Detectores de fluorescencia para HPLC son semejantes en diseños a los fluorómetros, la fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Los detectores más sencillos utilizan

una fuente de excitación de mercurio, y uno o más filtros para aislar la radiación emitida. Los instrumentos más sofisticados consisten en una fuente de radiación de xenón y emplean un monocromador de red para aislar la radiación fluorescente. Una ventaja de los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad (1×10^{-12}), que resulta ser de más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbancia.

4.3 Cromatografía de reparto.

Este tipo de cromatografía se puede subdividir en cromatografía *líquido-líquido* y cromatografía de *fase unida químicamente*. La diferencia entre estas radica en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno. En líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física, en fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. Los métodos líquido-líquido tienen la desventaja de la pérdida de fase estacionaria por disolución en la fase móvil, lo que hace necesario un constante recubrimiento de las partículas del soporte, y el problema de la solubilidad de la fase estacionaria, lo que impide el uso de la elución con gradiente.

En cromatografía de reparto, los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10μ . La superficie de la sílice totalmente hidrolizada está constituida por grupos silanol químicamente reactivos. Los recubrimientos de fase unida químicamente más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano, con un grupo R, que puede ser un alquilo o un alquilo sustituido.

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto, la cromatografía en fase normal, en donde la fase estacionaria es de elevada polaridad, como por ejemplo agua o trietilenglicol soportada sobre partículas de sílice o alúmina; y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente apolar como hexano o isopropileter. En la cromatografía de fase inversa la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, metanol, acetonitrilo). En cromatografía en fase normal, el componente menos polar se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil, y un aumento en la polaridad de la fase móvil provoca una disminución en el tiempo de la elución. Por contraste, en los métodos de fase inversa aparecen primero los componentes más polares y un aumento en la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución.

Los rellenos de fase unida químicamente se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento enlazado tiene un carácter no polar, y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares.

Para tener una separación exitosa se requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los tres participantes activos en el proceso, el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los tres reactivos.

Al elegir una columna para la separación por cromatografía de reparto, la polaridad de la fase estacionaria debe de ser bastante similar a la de los analitos, y para la elusión se utiliza entonces una fase móvil con polaridad considerablemente distinta. Una vez hecha la elección, se debe de realizar una serie de ensayos tentativos obteniendo los

cromatogramas con varias fases móviles hasta que se llegue a una separación satisfactoria.

Los disolventes que más interaccionan con los solutos a menudo se denomina disolventes <<fuertes>> o disolventes polares. Se han desarrollado varios índices para describir cuantitativamente la polaridad de los disolventes. El más útil para la cromatografía de reparto parece ser el índice de polaridad P . Este parámetro se basa en las medidas de solubilidad para la sustancia en cuestión en tres disolventes: dioxano (un aceptor de protones de dipolo débil), nitrometano (un aceptor de protones dipolo intenso) y etanol (un donador de protones de dipolo intenso). El índice de polaridad es una medida numérica de la polaridad relativa de los disolventes.

El índice de polaridad P_{AB} de una mezcla de disolventes A y B viene dado por

$$P_{AB} = \phi_A P_A + \phi_B P_B$$

Donde P_A y P_B son los índices de polaridad de los dos disolventes, y ϕ_A y ϕ_B son las fracciones de volumen de cada uno.

La forma más fácil de mejorar la resolución cromatográfica de dos especies es manipulando el factor de retención K' , el cuál puede a su vez modificarse cambiando el índice de polaridad del disolvente. En este caso, el ajuste de P se consigue con facilidad utilizando fases móviles consistentes en mezclas de dos disolventes.

Muchas veces en las separaciones en fase inversa, se emplea una mezcla de disolventes formada por agua y un disolvente orgánico polar. El factor de retención se manipula entonces fácilmente variando la concentración de agua¹⁹.

En muchos casos, ajustar k' a un nivel adecuado es todo lo que se necesita para una separación satisfactoria. Sin embargo, cuando todavía se superponen bandas, se ha de procurar aumentar el factor de selectividad α para las dos especies.

4.4 Validación de métodos analíticos

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

La validación de un método analítico es un proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. El objetivo de la validación de los métodos analíticos es la de proveer datos analíticos de calidad conocida.

Parámetros de desempeño

- **Selectividad:** Es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros constituyentes en la muestra, y se refiere directamente a la capacidad del método para producir una respuesta para un solo analito. Se demuestra analíticamente trabajando con blancos, placebos (matrices usadas), productos de degradación o metabolitos.
- **Linealidad:** La linealidad es la proporcionalidad que existe entre la concentración de un analito y la respuesta que genera. Se utiliza el modelo de la ecuación de línea recta ($y=mx+b$) para su evaluación. Se realiza por triplicado.

Se deben de evaluar la linealidad del sistema y la linealidad del método.

Linealidad del sistema: es la proporcionalidad del análisis de estándares de referencia en el sistema de cuantificación, permitiendo obtener curvas de calibración. Las curvas de calibración se preparan con al menos 5 niveles de concentración del estándar, cada nivel, al menos por triplicado un día y otro triplicado el segundo día.

Linealidad del método: Es el comportamiento entre la concentración del compuesto de interés, en la muestra, y la respuesta obtenida descrito mediante la ecuación de la línea recta. En este punto debe abarcar la metodología involucrada en la preparación de la muestra (extracción, purificación, formación de derivados, etc.)

- **Precisión:** Es la concordancia entre dos o más valores obtenidos de la misma aplicación. Se realizan mediciones individuales, 5 determinaciones por concentración, un mínimo de 3 concentraciones. Estas concentraciones deben ser diferentes a las utilizadas en la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango.
- **Reproducibilidad:** Es la concordancia entre dos o más valores obtenidos en días diferentes con condiciones diferentes.
- **Repetibilidad:** Es la concordancia entre dos o más valores obtenidos en un mismo día.
- **Exactitud:** Describe la fidelidad de resultados obtenidos de prueba, obtenidos por el método para el valor verdadero del analito. Se determina por réplicas del análisis de muestras conteniendo cantidades conocidas del analito. Un mínimo de 5 determinaciones por concentración deben desarrollarse para un mínimo de 3 concentraciones en el rango de trabajo.
- **Límite de detección (LOD):** Cantidad mínima detectable por el método analítico. Se determina mediante A) alcance visual: hasta donde se puede detectar la señal del

analito mediante diluciones sucesivas. B) Nivel de ruido: Variación debida al instrumento que se usa, pueden emplearse para medir una respuesta del analito, y diferenciarlo de la señal del instrumento. C) Intercepción y pendiente, que es el punto donde se une la curva con el eje de las y el grado de inclinación de la curva, respectivamente

- Estabilidad: La estabilidad del analito en un fluido biológico es una de las condiciones de almacenamiento, de las propiedades químicas del analito y del contenedor. Se demuestra que la muestra permanece sin cambios
- Robustez y tolerancia: Los cambios están controlados, cambios de liberación para seguir manteniendo respuestas aceptables. La tolerancia se refiere a cambios no controlados; debe de hacerse durante el desarrollo del método analítico. Para evaluarse en el HPLC, los cambios que afectan la respuesta son el flujo, polaridad de la columna, de la fase móvil; diluciones²¹.

5. Hierro

El hierro es un micronutriente indispensable para el organismo humano ya que participa en gran variedad de procesos biológicos, tales como la eritropoyesis, en donde interviene en procesos de división celular y síntesis de hemoglobina, además es fundamental para el funcionamiento adecuado de numerosas enzimas, como la citocromo-oxidasa y la hidroxidroxidasa, por lo que su deficiencia puede deteriorar una amplia gama de funciones metabólicas incluida la respuesta inmunológica²².

Dentro del organismo hay tres factores principales que afectan el balance y el metabolismo del hierro que son el consumo, almacenamiento y las pérdidas. En cuanto al consumo, éste se determina por la cantidad que se consume y su biodisponibilidad en la

dieta y la capacidad de absorción del hierro. El hierro se absorbe principalmente en el intestino delgado, aunque una parte puede absorberse en el estómago. La cantidad de hierro que se absorbe de los alimentos puede variar entre <1 a <50%, la cantidad absorbida depende del tipo de alimento consumido y la interacción de dicho alimento con los mecanismos de regulación en la mucosa intestinal, que refleja la necesidad fisiológica de hierro⁸.

Con respecto a la dieta el hierro hemo y no hemo se absorben de diferente manera. El hierro no hemo consiste primariamente en sales de hierro, que se encuentran principalmente en plantas y productos lácteos siendo esta la forma más abundante de hierro en la dieta, es decir > 85%. La absorción del hierro no hemo está fuertemente influenciado por su solubilidad en la parte superior del intestino delgado, es decir que su solubilidad depende de la cantidad de potenciadores de solubilidad y la cantidad de inhibidores que haya consumido en su dieta.

El hierro hemo proviene principalmente de la hemoglobina y la mioglobina de la carne de res, pollo o pescado. Aunque la cantidad del hierro hemo consumida sea más pequeña que la cantidad de hierro no hemo, el hierro hemo se puede absorber de dos a tres veces más rápido que el hierro no hemo y es menos afectado por otros constituyentes de los alimentos⁸.

Se conocen un gran número de factores que potencian o inhiben la absorción del hierro no hemo. Solamente el hierro inorgánico de la dieta se absorbe en cantidades que tienen significación nutritiva, y mejor si está en forma ferrosa que férrica. Es por esto que sustancias reductoras como el ácido ascórbico, favorecen su absorción. Como inhibidores

de la absorción de hierro tenemos compuestos como el fosfato de calcio, fibra, ácido fítico (presente en granos no procesados) polifenoles (presentes en té y algunos vegetales)⁶.

La entrada de hierro al cuerpo está regulado por las células de la mucosa del intestino delgado, pero el mecanismo por el cuál la absorción es regulada permanece incierta.

El transporte del hierro desde la hemoglobina o desde el intestino delgado hacia los tejidos, está acompañado por la proteína transportadora del plasma, la transferrina. Esta proteína entrega hierro a los tejidos gracias a los receptores específicos de la transferrina de la membrana celular. Los receptores unen el complejo transferrina –hierro a la superficie de la célula y lo acarrear dentro de la célula, donde el hierro es liberado.

Los principales compuestos de reserva de hierro son la ferritina, que es un complejo soluble proteína-hierro, que contiene un 20% de hierro, y la hemosiderina, que es un complejo insoluble que contiene 35% de hierro. los cuales están presentes primariamente en el hígado, células reticuloendoteliales y en la médula. Cuando se almacena en forma de hemosiderina es porque la cantidad total de hierro en el organismo supera la que puede contener el fondo común de proferritina. Evidentemente la absorción de hierro está influida por el estado de las reservas del organismo. Al parecer el hierro de la dieta pasa al interior de las células del epitelio intestinal en forma de quelato con fructosa o sorbitol o con algunos aminoácidos⁸.

5.1 Deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro es una de las más comunes deficiencias nutrimentales en todo el mundo, afectando principalmente infantes mayores, niños pequeños, y mujeres en edad de tener hijos. Los niños pequeños son los más susceptibles a esta deficiencia debido a

que ellos requieren una cantidad relativamente mayor de hierro por su rápido crecimiento durante los primeros dos años de vida y su dieta usual es baja en hierro a menos de que sus alimentos sean suplementados con este nutrimento. De acuerdo a estudios anteriores, aproximadamente el 5% de los niños entre 1 y 2 años tienen evidencias de tener deficiencias de hierro según pruebas bioquímicas y la mitad de ellos son anémicos⁸. La anemia por deficiencia de hierro retrasa el desarrollo mental y maduración del infante e induce apatía y disminución en la exploración de su ambiente físico y social. En el niño de edad escolar, la anemia altera el desarrollo cognoscitivo y limita el rendimiento escolar. Las mujeres adolescentes están en alto riesgo de deficiencia de hierro debido a la combinación del rápido crecimiento y la pérdida menstrual de sangre. En el adulto, limita la capacidad de trabajo intenso y constituye un obstáculo para el avance social de las personas afectadas y sus familias. Todos estos son reversibles con los tratamientos adecuados¹⁵.

Etapas de la deficiencia de hierro

- a) Reducción en las reservas de hierro
- b) Reducción del abastecimiento del hierro a tejidos
- c) Incrementa la variabilidad del tamaño de las células rojas

5.2 Toxicidad del hierro

El potencial tóxico del hierro deriva principalmente de su propiedad biológica, la habilidad de existir en dos formas de oxidación, Fe^{2+} (forma ferrosa) y Fe^{3+} (forma férrica). El hierro sirve como catalizador en las reacciones redox, donando o aceptando electrones. Algunas de las reacciones redox, cuando no están moduladas correctamente por antioxidantes o sustancias quelantes de hierro, pueden dañar los componentes celulares como ácidos

grasos, proteínas, y ácidos nucleicos. Un gran número de desordenes de salud están relacionados con la exposición a corto o largo plazo del hierro en cantidades que exceden la capacidad fisiológica de protección contra su reactividad.

La toxicidad aguda por hierro es casi siempre debido a la ingestión accidental de medicamentos que contienen hierro y ocurre frecuentemente en niños. La intoxicación severa ocurre después de una ingestión mayor a 0.5 g de hierro o 2.5 g de sulfato ferroso. La intoxicación se manifiesta con vómito ensangrentado debido a la ulceración del tracto gastrointestinal, esto es seguido de signos de shock y acidosis metabólico, daño hepático. Efectos posteriores incluyen falla renal y cirrosis hepática. La toxicidad crónica de hierro o la sobredosis de hierro en el adulto es un problema más común. Existen tres vías por la cuál puede haber una acumulación excesiva de hierro en el organismo, la primera una hemocromatosis idiopática debido a una absorción anormal del hierro en el tracto intestinal. La condición puede ser genética, la segunda causa posible de sobredosis por hierro es el exceso de hierro en la dieta. Existen casos esporádicos en el que el este se debe a ingestión excesiva de medicamentos o tónicos que contienen hierro. La tercera causa es por el requerimiento regular de transfusión sanguínea, usualmente llamado siderosis transfusional. En la toxicidad crónica por hierro el contenido de hierro en el organismo aumenta de entre 20 y 40 g. La mayoría del hierro en exceso está en forma de hemosiderina. Las concentraciones más altas se encuentran en las células parenquimales del hígado y páncreas, así como en los órganos endocrinos y corazón. El hierro en células reticuloendoteliales (bazo) es muy alto en el caso de las siderosis transfusional. Los efectos locales más severos por el envenenamiento por hierro es una necrosis hemorrágica del tracto gastrointestinal que se manifiesta por vómito y diarrea con sangre²³.

Los síntomas de esta enfermedad incluyen debilidad y pérdida de peso, dolor abdominal, agrandamiento del hígado, y eventualmente una cirrosis del hígado²⁴.

6. Efecto sinérgico entre la vitamina A y el hierro

Los estudios epidemiológicos indican que la deficiencia de la vitamina A y la anemia coexisten y que hay una asociación significativa entre el retinol sérico y los indicadores bioquímicos de los niveles de hierro²⁵.

Se ha demostrado en estudios anteriores²⁶ que los adultos humanos depletados de vitamina A desarrollaban anemia que respondía a tratamientos con hierro solo después de mejorar sus niveles de vitamina A. También se demostró⁵ que al suplementar las dietas con vitamina A en personas que presentan anemia daba como resultado un incremento en los niveles de hemoglobina y hierro sérico, por lo que el porcentaje de saturación de transferrina también se veía aumentado, es decir, la cantidad de hierro llevado a tejidos del cuerpo. La magnitud de los cambios en estos parámetros de hierro se ve potenciado cuando las dietas se suplementan con hierro y vitamina A.

Se realizaron diferentes estudios⁶ sobre la interacción de varios micronutrientes en la absorción de hierro en dietas, especialmente después de 1993 cuando empezó el programa nacional de fortificación de las harinas precocidas de maíz y trigo con hierro y vitaminas.

En dichos estudios se encontró que la vitamina A y los β -carotenos, precursores de la vitamina A, jugaban un papel muy importante en la absorción de hierro, especialmente en alimentos que tenían un alto contenido de inhibidores como fitatos y polifenoles. No se conoce con exactitud el mecanismo de acción de la vitamina A.

La población con bajo nivel socioeconómico de Asia, África y Latinoamérica tiene dietas de baja biodisponibilidad del hierro debido al alto consumo de cereales, leguminosas y tubérculos, que contienen una gran cantidad de ácido fítico. La fortificación con vitamina A puede prevenir la deficiencia de este micronutriente, pero también puede potenciar la fortificación de hierro.

7. Evaluación Biológica

A través de la historia, los estudios con animales han contribuido enormemente a la comprensión de las funciones fisiológicas y bioquímicas de los nutrientes. Dentro de las ventajas de uso de animales de laboratorio se encuentra que la metodología es más flexible que la que se puede utilizar con los humanos, ya que se logra tener control sobre la dieta cuantitativamente. Además la genética y el ambiente son controlables, permitiendo la evaluación de variables específicas.^{27,28}

Los métodos de evaluación de la calidad nutricional de las proteínas deben evaluar las funciones principales de las proteínas como son la síntesis de proteínas tisulares y el mantenimiento corporal.

Los métodos biológicos para determinar la calidad proteínica, generalmente se dividen en dos grupos principales:

- a) Los basados en la ganancia de peso corporal y
- b) Los basados en la retención de nitrógeno.

Existen factores que ejercen influencia sobre los resultados de algunos bioensayos como son:

- Edad y sexo del animal
- Cepa
- La calidad y cantidad de proteína
- Tiempo de experimentación
- Condiciones ambientales

7.1 Relación de eficiencia proteínica (REP)

En 1919, Osborne, Mendel y Ferry²⁹ introdujeron el concepto de Relación de Eficiencia Proteínica (REP), el cuál es el procedimiento más utilizado dentro de las pruebas biológicas en la evaluación de una fuente de proteína. Generalmente se acepta que el incremento de peso de ratas destetadas alimentadas con una dieta, bajo condiciones estandarizadas, provee una medida confiable del valor nutritivo de una proteína dietética. Las condiciones para la determinación de la REP fueron reportadas por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC)³⁰ e incluyen el empleo de dietas, animales y duración de una prueba estandarizados.

Para poder detectar pequeñas diferencias en la calidad de la proteína es necesario una estricta estandarización del procedimiento experimental, las condiciones climáticas son de las más importantes. La temperatura del cuarto debe de estar entre 22 y 24°C, la humedad relativa entre 50 y 65%. El peso, la cepa y el sexo de los animales experimentales debe ser estandarizada, teniendo como prerrequisito utilizar animales sanos. La diferencia de peso en el peso inicial de los animales no debe variar en más de 10g.

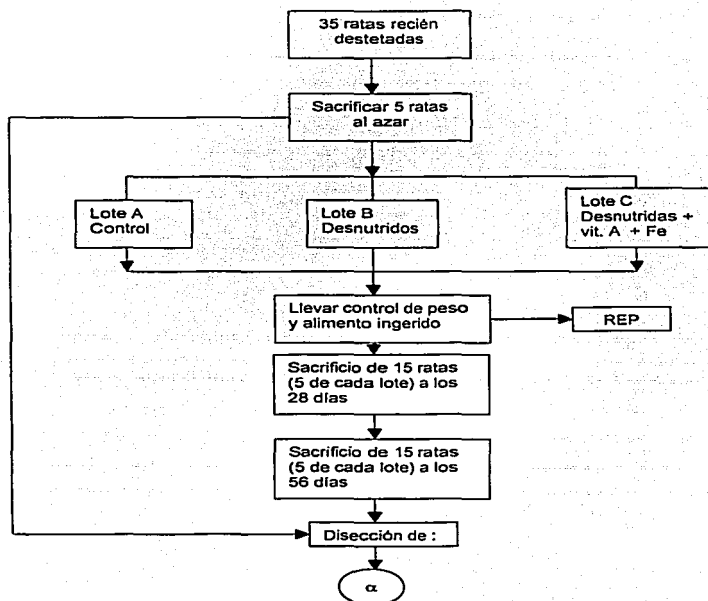
Este método es el más simple para evaluar la calidad de una proteína, se calcula a las cuatro semanas y se define como:

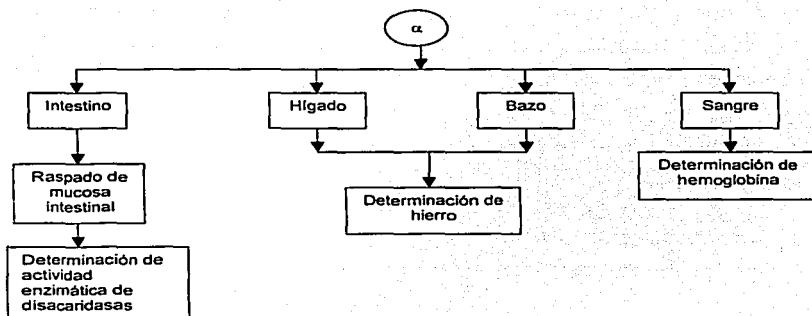
$$\text{REP} = \text{ganancia en peso (g)} / \text{proteína ingerida (g)}$$

La crítica más fuertemente hecha a la REP es que considera que toda la proteína ingerida es utilizada para el crecimiento y no toma en cuenta la proteína necesaria para el mantenimiento de los sujetos en estudio²⁹.

IV. METODOLOGÍA

1. Diagrama general de la investigación





2. Descripción de la metodología

2.1 Bioensayo

El ensayo biológico se realizó con 35 ratas macho, de la cepa Wistar con una edad de 21 días, recién destetados, y con un peso inicial de 40 g con una variación de ± 10 g. Se pesaron y se distribuyeron en siete lotes de cinco ratas cada uno por el método de culebra japonesa, que consiste en que una vez que se ordenan los pesos de las ratas de menor a mayor, se distribuyen en zigzag entre los grupos. La diferencia del peso promedio entre los lotes no debe ser mayor a 1 g. Se tomó el grupo siete para realizar las determinaciones iniciales de hemoglobina, hierro en órganos y actividad enzimática de disacaridasas del experimento. El resto de los animales ($n = 30$) fueron alimentadas con las diferentes dietas experimentales.

Las dietas que se utilizaron durante este bioensayo fueron las siguientes:

- ❖ Dieta A. Al 10% de proteína con un contenido energético de 430 Kcal/100g de alimento.
- ❖ Dieta B. Al 6% de proteína con un contenido energético de 250 Kcal/100g de alimento y con mezcla de vitaminas y minerales a la mitad.
- ❖ Dieta C. Igual que la dieta B, pero adicionado con Vitamina A y hierro

En las tablas 1 – 3 se muestra la composición de cada una de las dietas.

Cuadro No.1 Dieta A. Control al 10% de proteína (430kcal)

Ingrediente	%
Caseína (89.19%)	11.2
Sacarosa	22.0
Dextrina	25.0
Dextrosa	19.0
Manteca vegetal	8.0
Aceite de maíz	6.0
Mezcla de minerales	4.0
Mezcla de vitaminas	1.0
Celulosa	3.79

Cuadro No.2 Dieta B. al 6 % de proteína (250kcal)

Ingrediente	%
Caseína (89.19%)	6.73
Sacarosa	15.08
Dextrina	17.14
Dextrosa	13.03
Manteca vegetal	2.86
Aceite de maíz	2.14
Mezcla de minerales	2.0
Mezcla de vitaminas	0.5
Celulosa	40.52

Cuadro No. 3 Dieta C. al 6% de proteína (250kcal) con suplemento de vitamina A y hierro

Ingrediente	%
Caseína (89.19%)	6.73
Sacarosa	15.08
Dextrina	17.14
Dextrosa	13.03
Manteca vegetal	2.86
Aceite de maíz	2.14
Mezcla de minerales	2.0
Mezcla de vitaminas	0.5
Vitamina A (268,000 UI)	0.02035
Hierro	0.150
Celulosa	40.35

Los grupos de animales que se manejaron en el bioensayo quedaron de la siguiente forma:

- Grupo 1. Dieta A alimentado por un período de 28 días
- Grupo 2. Dieta B alimentado por un período de 28 días
- Grupo 3. Dieta C alimentado por un período de 28 días
- Grupo 4. Dieta A alimentado por un período de 56 días
- Grupo 5. Dieta B alimentado por un período de 56 días
- Grupo 6. Dieta C alimentado por un período de 56 días

Los animales de cada lote se mantuvieron en jaulas individuales con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas/ 12 horas y con temperatura controlada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). Una vez que se formaron los lotes, se le colocó a cada animal su respectiva dieta, previamente pesada

y agua *ad libitum*. Como las ratas tienden a desperdiciar alimento, se les colocó una charola de papel debajo de sus jaulas, para poder recuperar el alimento que tiren y considerarlo dentro del peso del alimento no consumido. Durante el ensayo se llevó un control del peso y del alimento ingerido cada tres días.

Después de 28 días se sacrificaron las ratas de los grupos 1, 2 y 3 y a los 56 días de ensayo se sacrificaron los grupos 4, 5 y 6.

Antes de sacrificar a los animales se dejaron en ayuno de 12 horas, con el fin de disminuir las variaciones en la actividad enzimática por la presencia de alimento.

Antes de sacrificar a las ratas se determinó el contenido de hemoglobina, obteniendo la sangre a partir de la cola, posteriormente se sacrificó a la rata cortándole la yugular para obtener la mayor cantidad de sangre posible, durmiendo antes a la rata en una cámara de CO₂. Ya que se obtuvo la sangre, se hace la disección de el hígado, el bazo y el intestino delgado.

2.2 Preparación del homogenizado de la fracción del borde en cepillo del intestino delgado de rata^{31, 32}

Reactivo y equipos

- Solución de cloruro de sodio 0.15M

Pesar 8.7835 g de cloruro de sodio (99.8% pureza) y aforar a 1000 ml.

- Equipo de disección
- Portaobjetos
- Tubos de centrífuga con tapa
- Homogenizador con pistilo de vidrio, Pyrex con capacidad de 40 ml.
- Tubos eppendorff

- Cajas Petri
- Vaso de precipitados de 100 ml.

Metodología

Después de sacrificar a las ratas retirar el intestino delgado desde el duodeno a la altura del píloro hasta la válvula ileocecal. Una vez que se retira el intestino se lava con 15-20 ml de solución fría de cloruro de sodio 0.15M. se abre el intestino y se procede a realizar el raspado de la mucosa intestinal con un portaobjetos, colocándola en un tubo de centrifuga previamente pesado, el raspado continúa hasta que se retira toda la mucosa, desechando el resto del intestino.

Posteriormente se pesa el tubo y por diferencia se obtiene el peso de la mucosa a partir de la cual se adiciona cloruro de sodio 0.15M en una proporción de 4 volúmenes por gramo de mucosa (v/m).

La homogenización se realiza manualmente en un homogenizador con pistilo de vidrio a intervalos de un minuto, cinco veces. Se almacena a -70°C por 24 horas, transcurrido dicho tiempo se homogeniza nuevamente (2 repeticiones de un minuto cada una). El homogenizado se coloca en alícuotas de 1ml en tubos de eppendorff y se guardan a -70°C .

Nota 1. En toda la preparación del homogenizado es necesario mantener la mucosa en baño de hielo.

2.3 Determinación de actividad enzimática de disacaridasas.

2.3.1 Ensayo enzimático de las disacaridasas

Para esta determinación se utilizó la técnica descrita por Carmona³¹

Fundamento



Este método se basa en la incubación de un disacárido (maltosa, sacarosa, lactosa), con la disacaridasa apropiada, seguida de un ensayo de liberación de glucosa en condiciones adecuadas de tiempo y temperatura.

La glucosa liberada en el ensayo enzimático se determina por el método de glucosa oxidasa peroxidasa, que se describe posteriormente.

Reactivos y equipo

- Buffer de citratos pH= 6.0, (0.1M)^{33, 34}

Dissolver 0.265 g de ácido cítrico monohidratado y 2.9282 g de citrato de sodio dihidratado en agua y llevar a 100ml: Ajustar a pH 6, guardar en refrigeración, protegido de la luz.

- Buffer de citratos pH= 6.3, (0.1M)^{33, 34}

Dissolver 0.1583 g de ácido cítrico monohidratado y 3.0984 g de citrato de sodio dihidratado en agua y lleva a 100ml. Ajustar pH a 6.3, guardar en refrigeración, protegido de la luz.

- Solución de maltosa (50mg/ml). Sigma M-5885

Dissolver 0.5263 g de maltosa monohidratada en buffer de citratos pH 6.3 y llevar a 10 ml. Guardar en refrigeración.

- Solución de sacarosa (50mg/ml). Sigma S-7903

Disolver 0.5 g de sacarosa anhidra en buffer de citratos pH 6.3 y llevar a 10 ml. Guardar en refrigeración.

- Solución de lactosa (50mg/ml). Sigma L-3625

Disolver 0.5263 g de lactosa monohidratada en buffer de citratos pH 6 y llevar a 10 ml. Guardar en refrigeración.

- Ácido clorhídrico (5mol/l)

Tomar 41.5 ml de ácido clorhídrico (PM. 36.46g/mol, 37% ácido clorhídrico y densidad 1.187g/ml) y llevar a 100 ml

- Buffer Tris (0.5mol/l, pH=7.0)

Disolver 61g de Tris en 85ml de ácido clorhídrico, 5mol/l, y diluir con agua a 1000ml; si es necesario ajustar el pH a 7.0

- Solución salina (0.15M)

Disolver 90g de cloruro de sodio en agua y llevar a 1000ml.

Nota: Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua para la preparación de los reactivos deberá ser destilada.

- Baño de agua, VWR Brand Immersion Circulators (Modelo 1112)
- Centrífuga Sorval (Modelo Super T 21)
- Espectrofotómetro Sequoia Turner (modelo 340), con celdas de 1cm.
- Homogeneizadores con pistilo de vidrio, Pirex con capacidad de 40 ml.
- Pipetas automáticas (50-200 μ l, 100-1000 μ l, 2-10ml)
- Tubos de ensaye 13x100
- Vortex LAB-LINE (Modelo 1290)

Preparación de los hidrolizados de las disacaridasas

MALTASA

En un tubo de ensaye se prepara la mezcla de ensayo en la que se adicionan: 0.5 ml de la fracción del borde del cepillo diluida- usado como fuente de enzima-, 0.36 ml de solución de maltosa, como sustrato (50mg/l) y 0.14 ml de buffer de citratos 0.1M a pH 6.3. La reacción empieza con la adición de la solución de maltosa. La mezcla es incubada a 37°C por 60min. La reacción se interrumpe al colocar los tubos de las muestras por 4min en un baño de agua hirviendo (92 ± 1 °C).

El blanco de la muestra se obtiene al adicionar el sustrato (maltosa) al tubo con la alícuota de la fracción del borde en cepillo e introducir inmediatamente el tubo al baño de agua hirviendo, dejarlo durante 4min. Esto tiene como propósito corregir las lecturas al determinar la cantidad de glucosa libre presente en la fracción del borde del cepillo del intestino delgado y del sustrato.

Para determinar la concentración de glucosa liberada en la muestra se hace uso del método de glucosa oxidasa peroxidasa, descrito posteriormente.

Nota: Las diluciones respectivas son: 1:10 en ratas recién destetadas, 1:110 en ratas con 28 días de ensayo y 1:200 en ratas con 56 días de ensayo

SACARASA

En un tubo de ensaye adicionar 0.5 ml de la fracción diluida del borde del cepillo- como fuente de enzima-, 0.36 ml de solución sustrato de sacarosa (50mg/ml) y 0.14 ml de buffer de citratos pH 6.3. La reacción empieza con la adición de la solución de sacarosa, la

mezcla de reacción se incuba a 37°C por 60 min. La reacción se detiene al adicionar 1.5ml de buffer tris pH 7.0 a las muestras (nota 2).

El blanco de la muestra se obtiene al adicionar al tubo con la fracción diluida del borde del cepillo, los 1.5 ml de buffer tris pH 7.0, inmediatamente después de adicionar el sustrato (sacarosa). Para corregir las lecturas al determinar la cantidad de glucosa libre presente en la fracción del borde del cepillo del intestino delgado y sustrato.

Para determinar la concentración de glucosa liberada en la muestra se hace uso del método de glucosa oxidasa peroxidasa, que se describe más adelante.

Nota 1: Las diluciones son: 1:20 en ratas recién destetadas, 1:30 en ratas con 28 días de ensayo y 1:60 en ratas con 56 días de ensayo

Nota 2: El usar el buffer tris pH 7.0 tiene la doble función de interrumpir la actividad de la disacaridasa al final del periodo de incubación e inhibir la actividad de disacaridasas contaminantes del reactivo de glucosa- oxidada.

LACTASA

En un tubo de ensaye adicionar 0.5 ml de la fracción diluida del borde del cepillo- como fuente de enzima-, 0.36 ml de solución sustrato de lactosa (50mg/ml) y 0.14 ml de buffer de citratos pH 6.0. La reacción empieza con la adición de la solución de lactosa, la mezcla de reacción se incuba a 37°C por 60 min. La reacción se interrumpe al colocar los tubos de las muestras en agua hirviendo (92 ± 1 °C) durante 4 min.

El blanco de la muestra se obtiene al adicionar el sustrato (lactosa) al tubo que contiene la alícuota de la fracción del borde en cepillo y meter inmediatamente el tubo al agua

hirviendo y dejarlo reposar por un tiempo de 4 min. Con la finalidad de corregir las lecturas al determinar la cantidad de glucosa libre presente en la fracción del borde del cepillo del intestino delgado y del sustrato.

Para determinar la concentración de glucosa liberada en la muestra se hace uso del método de glucosa oxidasa peroxidasa, que se describe enseguida.

Nota: Las diluciones de estos ensayos fueron: 1:10 en ratas recién destetadas, 1:10 en ratas con 28 días de ensayo y 1:10 en ratas con 56 días de ensayo

Cálculos de actividad enzimática

La cantidad de glucosa liberada (muestra menos el blanco) es medida a partir de la curva estándar.

La actividad enzimática se expresa frecuentemente en términos de unidades (U). Donde una unidad de actividad de disacaridasa es la hidrólisis de un μmol de disacárido por un minuto a 37°C

Unidad de actividad
enzimática

$$\left(\frac{\mu\text{g glu} \times \text{factor de dilución}}{60\text{min} \times 0.5\text{ml} \times \text{unidades de glu} \times 180} \right)$$

Las unidades de actividad enzimática se expresan en U/ml. Las unidades de glucosa será de 1 para los casos en que el hidrolizado use sacarosa y lactosa y de 2 para el caso de maltosa. Los 0.5 ml indican la cantidad de mucosa homogenizada diluida que se utiliza en el ensayo.

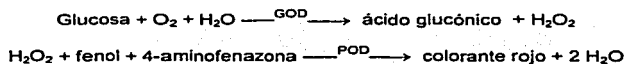
$$\text{Actividad específica} = \left(\frac{\text{Unidad de actividad enzimática (U/ml)}}{\text{Concentración de proteína (mg/ml)}} \right) = \text{U / mg de proteína}$$

Para calcular la actividad específica de una enzima se expresa en términos de U/mg de proteína.

2.3.2 Determinación de glucosa por el método de glucosa oxidasa peroxidasa

Método enzimático, colorimétrico, de punto final de Trinder³⁵, con modificaciones de Bergmeyer³⁶.

Fundamento



Para determinar la concentración de glucosa liberada en el ensayo enzimático, la glucosa es oxidada por la glucosa-oxidasa (GOD) en solución acuosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona en presencia de la peroxidasa (POD) con el fenol y la 4-aminofenazona, para formar un colorante rojo.

La intensidad del color que se desarrolla es proporcional con la concentración de glucosa y puede ser medida en el espectrofotómetro a 520 nm.

Reactivos y equipo

- Reactivo de glucosa oxidasa peroxidasa A (Hycl No. 70408), para maltasa y lactasa. Disolver el contenido del frasco en agua destilada o desionizada, aforar a 500 ml.

- Reactivo de glucosa oxidasa peroxidasa B (Hycel No. 70408), para sacarasa.

Disolver el contenido del frasco en 50 ml de agua a temperatura ambiente, aforar a 500ml con buffer tris pH 7.

- Solución estándar de glucosa (10 mg/ml). J.T. Baker, No. 50-99-7

Disolver 100 mg de glucosa anhidra en agua y llevar a 10 ml.

Nota: Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua deberá ser destilada.

- Baño de agua, VWR Brand Immersion Circulators (Modelo 1112)
- Centrífuga Sorvall (Modelo Super T 21)
- Espectrofotómetro Sequoia Turner (Modelo 340), con celdas de 1 cm.
- Pipetas automáticas (50-200 μ l, 100-1000 μ l, 2-10 ml)
- Tubos de ensaye 13x100
- Vortex LAB-LINE (Modelo 1290)

Metodología

MALTASA Y LACTASA

En un tubo de ensayo adicionar 0.2 ml del hidrolizado obtenido en el ensayo enzimático de las disacaridasas y agregar 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa A (el cual debe estar a temperatura de 37°C), mezclar por agitación con vortex e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. Y leer en el espectrofotómetro a 520nm contra blanco de reactivos.

SACARASA

En un tubo de ensayo adicionar 0.5 ml del hidrolizado obtenido en el ensayo enzimático de las disacaridasas y agregar 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa B (a temperatura de 37°C), mezclar por agitación con vortex e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. Y leer en el espectrofotómetro a 520nm contra blanco de reactivos.

Preparación de la curva patrón de glucosa para:

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA LIBERADA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE MALTASA Y LACTASA

Hacer una dilución de 1:10 de la solución estándar de glucosa (10 mg/ml), para tener una solución de glucosa con una concentración final de 1 mg/ml. A partir de ésta preparar soluciones con concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml. El blanco de reactivos se obtiene al adicionar 0.2 ml de agua desionizada y 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa A.

Se toman 0.2 ml de alícuota de las soluciones estándar de glucosa y se les agregan 2.5 ml de reactivo glucosa-oxidasa-peroxidasa A (previamente calentado a 37°C), mezclar e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. Y leer en el espectrofotómetro a 520nm.

Se debe ajustar el espectrofotómetro con el blanco de reactivos de la curva patrón.

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA LIBERADA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE SACARASA

Hacer una dilución de 1:10 de la solución estándar de glucosa (10mg/ml), para tener una solución de glucosa con una concentración final de 1mg/ml. A partir de ésta preparar soluciones con las siguientes concentraciones 100, 80, 60, 40, 20 µg/ml. El blanco de reactivos se obtiene al adicionar 0.5 ml de agua desionizada y 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa B.

Se toman 0.2 ml de alícuota de las soluciones estándar de glucosa y adicionarles 0.3 ml de buffer tris (para contrarrestar la dilución efectuada por el buffer tris, al detener la reacción en el ensayo para determinar la actividad enzimática) posteriormente agregar 2.5

ml de reactivo glucosa-oxidasa-peroxidasa B (previamente calentado a 37°C), mezclar e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. Y leer en el espectrofotómetro a 520nm.

Se debe ajustar el espectrofotómetro con el blanco de reactivos de la curva patrón.

Cálculos

Las curva patrón de glucosa se elaboran con al menos 4 estándares de glucosa de concentraciones entre los 0-100 µg de glucosa y se leen en un espectrofotómetro a 520nm. Se elabora una gráfica de concentración contra absorbancia.

La concentración de glucosa en µg/ml de la solución evaluada (muestra menos blanco), se lee a partir de la curva de calibración. Este resultado se multiplica por la dilución y se convierte de microgramos a miligramos.

2.3.3 Determinación de Proteína

Método de Lowry.³⁷

Fundamento

Este método combina el uso de la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con los iones cobre en medio alcalino, con la reducción del reactivo fenol Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfotungstico) por los residuos de tirosina y triptofano. Para determinar la cantidad de proteína se prepara una curva de calibración usando albúmina sérica bovina (como estándar de referencia). Tanto la curva como las muestras problemas se leen en el espectrofotómetro a 750 nm.

Reactivos y equipo

- Solución de hidróxido de sodio (0.8mol/l)

Disolver 32 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua y llevar a 1000 ml

- Reactivo A

Disolver 0.2 g de tartrato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 10 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) en 69 ml de solución de hidróxido de sodio (0.8mol/l) y llevar a 100 ml con agua.

- Reactivo B

Disolver 2 g de tartrato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 12.5 ml de solución de hidróxido de sodio (0.8mol/l), llevar a 100 ml con agua. Almacenar protegiendo de la luz.

- Reactivo mezcla

Mezclar 25 volúmenes de solución de hidróxido de sodio (0.8mol/l), 18 volúmenes de reactivo A y 2 volúmenes de reactivo B. Preparar inmediatamente antes de su uso.

- Reactivo C

Diluir 1volumen de reactivo Folin-Ciocalteu comercial (SIGMA F-9252) con 2 volúmenes de agua: Esta mezcla deberá prepararse inmediatamente antes de su uso.

- Solución estándar de Albúmina Sérica Bovina. SIGMA A-3425

Disolver albúmina sérica bovina con agua y llevar a una concentración de 1mg/ml.

- Solución salina (0.15M)

Disolver 90g de cloruro de sodio en agua y llevar a 1000ml

Nota: Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua deberá ser destilada.

- Balanza analítica Sartorius Modelo A 210 P.

- Centrífuga Sorvall (Modelo Super T 21)
- Espectrofotómetro Sequoia Turner (Modelo 340), con celdas de 1 cm.
- Homogenizador con pistilo de vidrio Pirex, con capacidad de 40 ml.
- Pipetas automáticas (100-1000 μ l, 1-5ml y 1-10ml)
- Tubos de ensaye de 13x100
- Matraces volumétricos de 10, 100 y 1000 ml.
- Probeta graduada de 100 ml.
- Vortex LAB-LINE (Modelo 1290)

Metodología

A 1.2 ml del homogenizado de la mucosa intestinal previamente diluida (nota 2); adicionar 0.9 ml de reactivo mezcla y agitar en vórtex, adicionar 0.6 ml de reactivo C y agitar inmediatamente, adicionar nuevamente 0.6 ml de reactivo C y mezclar vigorosamente; incubar por 45 minutos protegiéndolos de la luz.

Leer las absorbancias de las muestras problema en un espectrofotómetro a 750nm. Se debe ajustar el espectrofotómetro con el blanco de reactivos de la curva patrón.

Para conocer el contenido de proteína en la muestra se hace uso de una curva patrón usando albúmina sérica bovina.

Nota 1: Las determinaciones se hicieron por triplicado, para cada muestra problema

Nota2: Para la determinación de proteína por este método se proceden a hacer diluciones del homogenizado concentrado, donde se busca que las soluciones tengan un contenido de 0.01 a 0.1 mg/l de proteína. La dilución utilizada fue de 1:400

Preparación de la curva patrón (con albúmina sérica bovina)

Preparar soluciones con concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$, a partir de la solución de albúmina sérica bovina (1mg/ml).

A 1.2ml de la solución estándar añadir 0.9ml de reactivo mezcla y agitar en vórtex, adicionar 0.6ml de reactivo C y agitar inmediatamente, adicionar nuevamente 0.6ml de reactivo C y mezclar vigorosamente; incubar por 45 minutos protegiéndolos de la luz.

Leer las absorbancias en un espectrofotómetro a 750nm contra un blanco de reactivos.

Trazar grafica de absorbancia contra concentración de albúmina sérica bovina($\mu\text{g/ml}$)

Cálculos

La concentración de proteína de la muestra se obtiene a partir de la curva de calibración y los resultados se expresan en μg de proteína /ml. El valor obtenido se multiplica por el factor de dilución y se convierte de microgramos a miligramos para reportar la concentración de proteína en mg / ml de homogenizado y así poder utilizar este valor para expresar la actividad enzimática en U/mg de proteína.

2.3.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos aplicados a los resultados obtenidos en este trabajo fueron los siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación, análisis de varianza para clasificación de una vía y prueba de rangos múltiples de Duncan; haciendo uso del programa estadístico Statgraphics versión 5.0.

2.4 Determinación de Hemoglobina

Método de Vanzetti³⁸

Fundamento

El desoxicolato de sodio hemoliza los eritrocitos y la hemoglobina es liberada. El nitrato de sodio convierte a la hemoglobina a metahemoglobina el cuál junto con la azida de sodio da azidametahemoglobina. La absorbancia es medida a dos longitudes de onda (570 y 880nm) para compensar la turbidez en la muestra.

Reactivos y equipo

- Desoxicolato de sodio
- Nitrito de sodio
- Azida de sodio
- Equipo de HemoCue Blood Hemoglobin Photometer^{MR}
- HemoCue B-Hemoglobin Cuvettes^{MR}

Nota: Los reactivos antes mencionados se encuentran contenidos en las microcubetas utilizadas.

Metodología

Cortar la punta de la cola de la rata, desechar las tres primeras gotas de sangre, para estimular la fluidez de la sangre. Si es necesario aplicar presión al masajear la cola para obtener mayor cantidad de sangre.

Antes de tomar la muestra de sangre, asegurarse de que la gota sea lo suficientemente grande para llenar la microcubeta^{MR}. Una vez que se tiene la cantidad suficiente de sangre acercar la microcubeta^{MR} a la gota, la cubeta se llenará por capilaridad. Limpiar el exceso de sangre de la microcubeta^{MR} y colocarla en su lugar y ponerla en posición de medir, después de 15 a 45 segundos el resultado aparece en la pantalla.

2.5 Determinación de hierro en hígado y bazo

Se decidió medir hierro por el método colorimétrico y por el de absorción atómica para averiguar si éste era equivalente al primero, ya que no siempre se dispone del equipo de absorción atómica.

2.5.1 Método de absorción atómica³⁹

Fundamento

Se basa en la absorción de luz por los átomos de un elemento a cuantificar en una muestra, cuando se hace incidir en ella un haz de luz emitido por una lámpara con una rigurosa longitud de onda definida, la cual corresponde a la longitud de onda de emisión característica del elemento particular escogido para el análisis. La extensión a la cual la luz es absorbida provee una estimación de la concentración del elemento en la muestra, la cual debe estar en solución.

Reactivos y equipo

- Ácido clorhídrico concentrado.
- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Parilla de calentamiento
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Matraz aforado de 5 y 10 ml
- Embudo de tallo corto
- Pinzas para crisol
- Muffa, Heraew
- Espectrómetro de absorción atómica, Perkin Elmer AAnalysis 300

Metodología

Se pesa la cantidad de órgano seco que se tenga en un crisol y se obtienen las cenizas quemando primero con mechero y posteriormente calcinando en mufla a 550°C hasta tener los crisoles a paso constante. Al crisol frío añadir con pipeta y en la campana 1 ml de ácido clorhídrico concentrado para disolver las cenizas. Evaporar en la campana, enfriar y añadir 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y 1 ml de agua destilada, con un agitador de vidrio tratar de disolver las cenizas en su totalidad. Pasar cuantitativamente el líquido a un matraz aforado de 10 ml si es hígado o de 5 ml si es bazo. Volver a lavar el crisol con agua dos o tres veces más, pasando los líquidos de lavado al matraz y después aforar. Filtrar y después del filtrado tomar muestras para hacer la medición. Se utilizó el equipo de absorción atómica Perkin Elmer AAanalysis 300, utilizando una longitud de onda de 248.3nm, el resultado se obtiene en ppm. Previamente se debe de ajustar el equipo con un estándar.

Cálculos

$$\frac{\text{mg Fe}}{100\text{g muestra}} = \left(\frac{(\text{ppm} \times \text{aforo de cenizas} \times 100)}{\text{mg de muestra}} \right)$$

2.5.2 Método colorimétrico⁴⁰Fundamento

Los iones de hierro (II) se hacen reaccionar con orto-fenantrolina para dar un complejo rojo anaranjado que se determina a 510nm. El hierro que se encuentra en forma de hierro (III) pasa a hierro (II), tras la disgregación y reducción con clorhidrato de hidroxilamina a iones II, y se determina como hierro total o como hierro soluble total.

Reactivos y equipo

- Ácido Clorhídrico concentrado.
- Solución de ortofenantrolina: Disolver 0.1g de ortofenantrolina en 80 ml de agua destilada a 80°C, enfriar y aforar a 100 ml con agua
- Solución de clorhidrato de hidroxilamina: Disolver 10 g de la sal en agua destilada y llevar a un volumen de 100 ml
- Buffer de acetatos: Disolver 8.3 g de acetato de sodio anhidro, adicionar 12 ml de ácido acético y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Estándar de hierro (0.01 mg/ml): Disolver 0.3512 g de sulfato de hierro y amonio, P.M. 392.14g ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en agua adicionando previamente unas gotas de HCl y aforar a 50 ml. Se toma 1 ml de dicha solución y se llevan a 100 ml con agua destilada.
- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Parrilla de calentamiento
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10ml
- Matraz aforado de 5 y 10 ml
- Embudo de tallo corto
- Pinzas para crisol
- Mufia, Heraeus
- Espectrofotómetro Sequoia Turner (Modelo 340), con celdas de 1 cm.

MetodologíaPreparación de la curva estándar

Se toman 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, y 6.0 ml de la solución estándar de hierro, ajustar cada uno de los tubos a 10 ml con agua y añadir en el siguiente orden: 1 ml de clorhidrato de hidroxilamina, agitar; 5 ml del buffer de acetatos, agitar y 1 ml de ortofenantrolina y agitar. Dejar en reposo entre 10 y 15 minutos. Leer a 530nm, usando el tubo cero como blanco.

Preparación de la muestra y determinación

Se pesa la cantidad de órgano seco que se tenga en un crisol y se obtienen las cenizas quemando primero con mechero y posteriormente calcinando en mufla a 550°C hasta tener los crisoles a peso constante. Al crisol frío añadir con pipeta y en la campana 1ml de ácido clorhídrico concentrado para disolver las cenizas, Evaporar en la campana, enfriar y añadir 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y 1 ml de agua destilada, con un agitador de vidrio tratar de disolver las cenizas en su totalidad. Pasar cuantitativamente el líquido a un matraz aforado de 10 ml si es hígado o de 5 ml si es bazo. Volver a lavar el crisol con agua dos o tres veces más, pasando los líquidos de lavado al matraz y después aforar. Filtrar y después del filtrado tomar una alícuota de 10 ml y desarrollar color en la misma forma que se hizo para la curva estándar. Si el color desarrollado es muy fuerte usar alícuotas más pequeñas y llevar el volumen final a 10 ml con agua destilada y desarrollar color nuevamente. Es importante añadir los reactivos en el orden descrito.

Cálculos

Leer la absorbancia del problema en la curva estándar y considerar el aforo y la alícuota utilizados.

$$\frac{\text{mg Fe}}{100\text{g muestra}} = \left(\frac{(\text{valor de la curva} \times \text{aforo})}{\text{mg de muestra}} \right) \times 100$$

2.6 Determinación de retinol

2.6.1 Determinación de retinol en plasma⁴¹

Fundamento

Dadas las características de solubilidad de retinol, éste puede ser removido del plasma y de los tejidos, por medio de una extracción con hexano, posterior a la adición de etanol para desnaturalizar y precipitar las proteínas (esencial para liberar el retinol de las proteínas ligadoras del retinol). Esta vitamina puede ser analizada por HPLC de fase reversa a su máxima longitud de onda.

Reactivos y equipo

- Solución de ácido ascórbico (0.01%)
- Acetato de retinol en etanol 20µg/100 ml como estándar interno
- Hexano grado reactivo analítico
- Etanol grado reactivo analítico
- Etanol grado HPLC
- Solución de hidróxido de potasio: Pesar 1 g de hidróxido de potasio y llevar a 2ml
- Cromatógrafo de líquidos de Alta Presión (Shimadzu Classvp)
- Detector UV de longitud de onda variable (Shimadzu Classvp SPD-10Avp)
- Baño de agua con temperatura controlada a 60°C
- Tanque de nitrógeno ultrapuro
- Centrifuga Sorvall (Modelo Super T 21)
- Ultracentrifuga, Sigma labor-centrifugen 2-15
- Acrodiscos de nylon 0.45 x 13 mm, Waters

Metodología

Se toman 300µl de suero en un tubo de polipropileno con tapón de 5 ml de capacidad, se agregan 300µl de solución de ácido ascórbico al 0.1% y 300µl de solución de acetato de retinol en etanol a una concentración de 20µg/100 ml. Posteriormente se añaden 1800µl de hexano, se tapa el tubo y se agita durante 90seg con reloj en un vortex, para separar las fases, se centrifugan los tubos a 2,500rpm durante 8 min. Se separa la fase orgánica y ésta se pasa a un vial de vidrio con 5ml de capacidad con tapón. Se extrae una vez más en las mismas condiciones.

Una vez que se junten los extractos, se evapora el hexano a sequedad bajo corriente de nitrógeno, ya que esté seco se redisuelve completamente con 300µl etanol agitando en un vortex, posteriormente se centrifuga por 30 min. a 2,500 rpm se toma el sobrenadante y finalmente este se filtra a través de los acrodiscos.

La muestra se debe conservar fría hasta la inyección al cromatógrafo.

Condiciones cromatográficas

- a) Columna Novapak C₁₈ de 15cm de longitud y 4 mm de diámetro interno
- b) Guardacolumna Novapak C₁₈
- c) Detección (longitud de onda) 325nm
- d) Volumen de inyección 50µl

2.6.2 Validación

Antes que nada se hizo la selección de las proporciones de los componentes que conforman la fase móvil. Posteriormente se inyectaron soluciones de retinol por quintuplicado cada punto y se registró el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, con la finalidad de evaluar la precisión en la obtención de las áreas. El coeficiente de variación debía ser menor a 2%.

Adecuabilidad.

Una vez establecidas las condiciones de análisis cromatográfico, se procedió a evaluar la adecuabilidad del sistema de análisis. Para realizar esta parte se utilizó un estándar de retinol proporcionado por la maestra Irene Montalvo del Dpto. de Nutrición del Centro Médico Siglo XXI del IMSS, para verificar que el sistema de análisis funciona correctamente.

Se inyectó por quintuplicado una curva patrón de retinol, reportándose la respuesta del analito, coeficiente de variación y factor de capacidad.

Se emplearon los siguientes criterios de aceptación, el coeficiente de variación debe ser menor a 2% y el factor de capacidad del analito debe ser mayor a 2. También se registró el tiempo de retención del analito, se determinó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, se empleó como límite de coeficiente de variación 2%.

Precisión del sistema y Linealidad del sistema

Se evaluaron estos dos parámetros analizando seis curvas estándar con cinco concentraciones de retinol, con acetato de retinol como estándar interno. La relación de áreas retinol/ acetato de retinol fue registrada como respuesta, la cual se midió y luego se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

El criterio de aceptación utilizado fue coeficiente de variación 5% y coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98.

Exactitud del método

Se inyectó una curva patrón de estándar de retinol, así como una curva de retinol en suero después de hacer la extracción como se explica en la metodología, se registró el área y se compararon las áreas obtenidas del estándar con las del medio en estudio así se obtuvo el porcentaje de recobro del retinol.

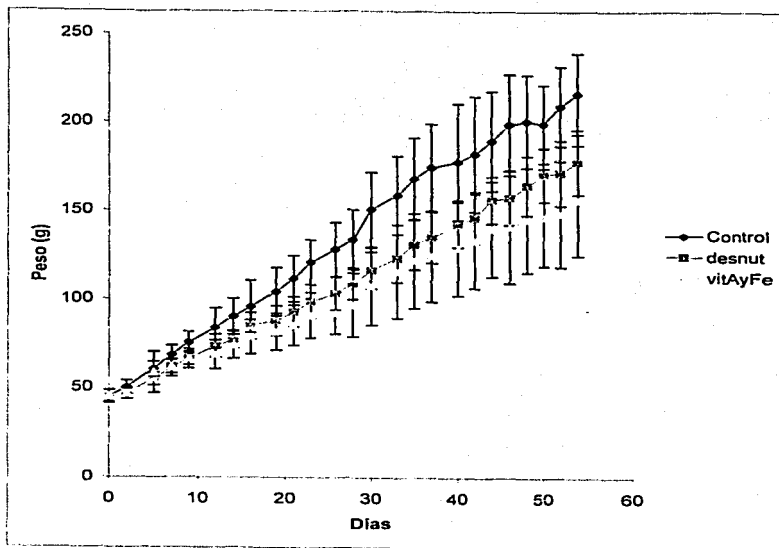
El criterio de aceptación utilizado fue recobro > a 70%.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba biológica

En la gráfica No. 1 se presentan las curvas de crecimiento de los animales durante los 56 días de ensayo, en el cuál se puede observar que el crecimiento de las ratas desnutridas (alimentadas con dieta B y C) no tuvo ninguna influencia favorecedora la adición de un exceso de minerales y vitaminas, lo que va de acuerdo con trabajos anteriores en donde se demuestra que el crecimiento está sólo en función de la proteína, esto también se confirma con los valores de relación de eficiencia proteínica (REP), herramienta utilizada para determinar el aprovechamiento de la proteína, obtenidos (cuadros No. 4, 5 y 6), es por esto que solo se encuentra una tendencia de disminución del valor de REP para los lotes de ratas desnutridas, aunque estadísticamente no son diferentes estos valores comparados con los del control (cuadro No.7). Para el caso de los animales desnutridos con suplemento de vitamina A y hierro se observa un menor crecimiento que el lote de ratas desnutridas aunque la diferencia entre estos dos lotes de desnutridos no es significativa.

Gráfica No. 1 Curvas de crecimiento de los animales alimentados con los tres tipos de dieta



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro No. 4 Cálculo del valor de REP para ratas de la dieta A.

rata	peso inicial	peso final	alim. ing.	REP	prom
1	37.9	117.7	233.8	3.41	3.18
2	45.1	145.7	323.9	3.10	desv. Std
3	45.2	131.1	298.6	2.88	0.38
4	48.1	129.0	285.1	2.84	%C.V.
5	48.4	113.9	266.1	2.46	12.15
6	39.6	119.6	242.9	3.29	REP ajust
7	44.6	158.5	334.7	3.40	2.5
8	46.0	125.3	204.8	3.87	
9	46.8	161.2	347.4	3.29	
10	49.4	145.3	298.3	3.21	

Cuadro No. 5 Cálculo del valor de REP para ratas de la dieta B.

rata	Peso inicial	peso final	alim. ing.	REP	prom
1	38.0	82.0	316.2	2.32	2.58
2	44.7	100.8	354.3	2.64	desv. Std
3	45.6	105.3	396.5	2.51	0.29
4	48.0	101.0	402.6	2.19	%C.V.
5	48.6	103.5	361.2	2.53	11.25
6	40.8	102.4	342.5	3.00	REP ajust
7	44.4	112.3	424.0	2.67	2.03
8	46.0	97.3	387.9	2.20	
9	46.7	114.4	416.3	2.71	
10	49.4	118.4	381.4	3.02	

Cuadro No. 6 Cálculo del valor de REP para las ratas de la dieta C.

rata	Peso inicial	peso final	alim. ing.	REP	prom
1	39.3	93.7	337.8	2.68	2.40
2	44.7	90.0	350.2	2.16	desv. Std
3	45.7	101.5	375.9	2.47	0.38
4	47.1	106.0	398.0	2.47	%C.V.
5	49.0	88.0	357.6	1.82	15.69
6	41.5	88.6	287.2	2.73	REPajust
7	43.6	75.0	270.6	1.93	1.89
8	46.1	121.7	410.2	3.07	
9	46.7	92.5	331.9	2.30	
10	50.0	106.7	395.1	2.39	

Cuadro No. 7 Valores de relación de eficiencia proteínica para las diferentes dietas que se utilizaron

Dieta	Valor de REP corregido
A	2.50 ± 0.38^a
B	2.03 ± 0.29^a
C	1.89 ± 0.38^a

Nota1: diferentes superíndices denotan diferencia significativa

Nota2: el valor de REP utilizado se tomó como indicativo del aprovechamiento de la proteína y no como valor de REP como tal, ya que la cantidad de proteína utilizada fue diferente

Hemoglobina

En el cuadro No. 8 se presentan los valores promedio de hemoglobina con sus desviaciones estándar, en el cuál se observa que el valor de hemoglobina de los animales recién destetados es bajo, aunque está dentro de lo normal 12-13g/dl, esto se explica ya que al estar recibiendo leche materna, la cantidad de hierro que hay en ésta es baja lo que causa obtener este valor, a comparación de los valores obtenidos en las ratas más grandes, que aunque no hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los 28 y 56 días de ensayo, se observa una tendencia de disminución en la cuál los animales alimentados con la dieta B y C presentan una menor concentración de hemoglobina, lo cuál se observa típicamente en situaciones de desnutrición. Lo que es importante mencionar aquí es que los animales tienen un buen nivel de hemoglobina y que aumentó con las dietas proporcionadas a comparación del tiempo cero.

Cuadro No.8 Concentración de hemoglobina de ratas en estudio dado en [g/dl]

Dieta	Tiempo cero	Tiempo de estudio	
		28 días de ensayo	56 días de ensayo
Control	13.48 ± 0.597	17.14 ± 0.391 ^a	18.60 ± 0.381 ^b
Desnutridas		16.48 ± 0.614 ^a	18.14 ± 0.230 ^b
Desnutrida + vit. A y hierro		16.52 ± 0.785 ^a	17.90 ± 0.636 ^b

Nota: diferentes superíndices denotan diferencia significativa

Hierro en órganos

En cuanto al hierro determinado en órganos (cuadro 9) se observó que las ratas que habían tenido una dieta suplementada con vitamina A y hierro (dieta C) obtuvieron valores muy altos de hierro en ambos tejidos, hígado y bazo, que son los órganos donde de manera normal se almacena el exceso de este mineral⁴². Esto se explica porque al absorberse el hierro, se acumula en dichos órganos para que cuando haya deficiencia de éste se utilice de allí, pero al tener valores tan altos de hemoglobina se demuestra que no se requiere de este mineral, por lo que se va a almacenar en diferentes órganos⁸. En cuanto a los resultados obtenidos por el método de absorción atómica, se reportaron únicamente los resultados del hierro en hígado de las ratas recién destetadas y de las ratas de 28 días de ensayo (cuadro 10), y como se puede observar se tuvieron valores muy parecidos a los obtenidos por el método colorimétrico por lo que ya no se realizaron las demás determinaciones. La concentración de hierro se midió a los 28 días que fue el tiempo que duró la primera parte del ensayo biológico.

Cuadro No. 9 Concentración de hierro en tejidos de las ratas en estudio por el método colorimétrico

Ratas	Hierro en Hígado	Hierro en bazo
	[mg Fe/100g de tejido]	[mg Fe/ 100g tejido]
Recién destetadas	57.622 ± 0.88 ^b	76.945 ± 2.05 ⁱ
Dieta A 28días	59.119 ± 3.132 ^b	129.742 ± 0.03 ^o
Dieta B 28 días	54.912 ± 1.95 ^b	119.915 ± 3.68 ^d
Dieta C 28 días	212.861 ± 4.69 ^a	164.860 ± 4.22 ^c

Nota: diferentes superíndices denotan diferencia significativa

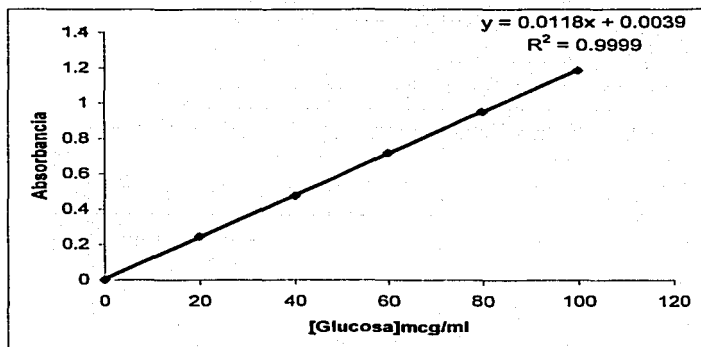
Cuadro No. 10 Concentración de hierro en tejidos de las ratas en estudio por el método de absorción atómica

Ratas	Hierro en Hígado [mg Fe/100g de tejido]
Recién destetadas	58.64
Dieta A 28días	65.37
Dieta B 28 días	54.30
Dieta C 28 días	212.23

Ensayo enzimático

En el análisis de las disacaridasas (lactasa, maltasa y sacarasa) se realizaron curvas de calibración, gráfica No. 2, en donde se observó buena linealidad cuando las concentraciones de glucosa estaban entre 0 y 100 µg/ml. Además el porcentaje de coeficiente de variación fue menor del 5%, estandarizándose así el análisis enzimático de las disacaridasas para el estudio, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro no. 11.

Gráfica No. 2 Curva patrón de glucosa para la cuantificación de glucosa liberada durante el ensayo enzimático



Cuadro No. 11 Valores obtenidos de la actividad enzimática durante la estandarización de la determinación.

Enzima	Promedio [U/mg de prot]	%CV
Maltasa	4.97 ± 0.02	0.48
Lactasa	0.34 ± 0.02	4.90
Sacarasa	1.35 ± 0.02	3.61

En el análisis de las muestras obtenidas durante el bioensayo se tuvieron los resultados que se muestran en el cuadro No. 12, en donde se puede observar que en la determinación del contenido de proteína, no se encuentra diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, lo cuál se puede interpretar diciendo que se mantiene la homeostasis.

Cuadro No. 12 Contenido de proteína en el homogenizado de la mucosa intestinal

Ratas	Proteína [mg proteína/ ml homog.]
Recién destetadas	13.926 ± 5.714^a
Dieta A 28 días	17.437 ± 2.152^a
Dieta B 28 días	16.125 ± 3.430^a
Dieta C 28 días	17.820 ± 0.775^a
Dieta A 56 días	16.483 ± 1.886^a
Dieta B 56 días	15.133 ± 2.537^a
Dieta C 56 días	15.423 ± 1.256^a

Nota: diferentes superíndices denotan diferencia significativa

En el cuadro No. 13 en cuanto a actividad específica de la lactasa se observa una tendencia de disminución en la actividad, aunque en algunos casos estadísticamente no haya diferencia significativa, también cabe mencionar que en las ratas recién destetadas la actividad de dicha enzima es baja en comparación a lo reportado por otros autores⁴³, lo cual se puede justificar ya que las ratas a esta edad comienzan a consumir del alimento de la madre, además de seguir amamantándose.

En el cuadro antes mencionado también se observa un aumento en la actividad enzimática de la maltasa y sacarasa, que para las ratas de 28 días de ensayo es significativamente diferente entre el control (alimentado con dieta A) y los dos lotes de ratas desnutridas (alimentadas con dieta B y C), y para las ratas de 56 días de ensayo se observa esa misma tendencia de aumento, aunque la diferencia no es significativa. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Rossi Tomas⁴⁴ en donde explican que en trabajos anteriores se ha demostrado que una alimentación restringida induce a una absorción y metabolismo de nutrientes más eficiente, en donde los animales adultos que reciben una dieta restringida exhiben un mayor nivel de disacaridasas.

Aunque se observa dicho aumento en la actividad enzimática entre el lote control y los lotes de ratas desnutridas, al mismo tiempo se puede ver una disminución no significativa en la actividad enzimática de las ratas desnutridas suplementadas con vitamina A y hierro con respecto a las ratas desnutridas, esto puede interpretarse como que el exceso de vitamina A y hierro tuvo un efecto adverso en la actividad de las disacaridasas.

La disminución en la actividad enzimática de las disacaridasas, observada en estudios previos, en individuos que consumen una dieta de mala calidad, no se vio en este caso ya que, aunque se consumió una dieta de bajo contenido protéico, la proteína utilizada era de buena calidad.

Cuadro No. 13 Actividad de las disacaridasas del intestino delgado de las ratas de estudio

Ratas	Lactasa [U / mg proteína]	Maltasas [U / mg proteína]	Sacarasa [U / mg proteína]
Recién destetadas	0.031 ± 0.007 ^a	0.243 ± 0.04 ^{ef}	0.069 ± 0.001 ⁱ
Dieta A 28 días	0.023 ± 0.002 ^{bc}	0.183 ± 0.007 ^f	0.082 ± 0.018 ⁱ
Dieta B 28 días	0.025 ± 0.003 ^{ab}	0.260 ± 0.026 ^e	0.124 ± 0.006 ^h
Dieta C 28 días	0.019 ± 0.002 ^c	0.223 ± 0.02 ^e	0.116 ± 0.011 ^h
Dieta A 56 días	0.027 ± 0.002 ^a	0.385 ± 0.03 ^d	0.121 ± 0.022 ^h
Dieta B 56 días	0.023 ± 0.002 ^{bc}	0.492 ± 0.107 ^d	0.193 ± 0.023 ^g
Dieta C 56 días	0.024 ± 0.003 ^{abc}	0.422 ± 0.025 ^d	0.167 ± 0.035 ^{gh}

Nota: diferentes superíndices denotan diferencia significativa

Análisis de retinol

A continuación, en el cuadro No.14 se presentan las condiciones que se establecieron para el análisis cromatográfico (HPLC) del retinol en suero. Estas condiciones son las mejores, bajo las cuáles se define bien el pico del retinol y su tiempo de retención no es tan largo, ni tan corto para confundirse con el frente de disolvente.

Cuadro No.14 Condiciones para análisis de retinol

Condiciones	
Columna	Novapak C18, con precolumna novapak C18
Detector	UV longitud de onda 325nm
Fase móvil	Metanol : agua (95:5)
Flujo	1.5ml /min
Volumen de inyección	50µl

Validación

La prueba de la precisión con la que el registrador integra las áreas fue satisfactoria. Las áreas promedio de las cinco señales producidas, quedaron como se muestra en el cuadro No. 15. En este se observa que en todos los casos se obtuvieron valores de coeficiente de variación menores a la magnitud establecida como criterio de aceptación de la prueba (2%), lo cual significa que existe repetibilidad en el sistema de estudio.

Cuadro No. 15 Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cinco repeticiones de una curva estándar.

Concentración de retinol (μg / ml)	Promedio áreas	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
6.25	41785	525.58	1.26
12.5	70495.8	1066.67	1.51
25	132346.8	1140.34	0.86
50	25747.1	3385.33	1.31
75	382509.8	6427.55	1.68
100	502925.6	2345.86	0.47

En el cuadro No. 16 se reporta el promedio del tiempo de retención con su desviación estándar y su coeficiente de variación, en este cuadro se muestra la repetibilidad en los tiempos de retención. Todos estos casos cumplen con el criterio de aceptación de coeficiente de variación menor del 2%. El tiempo muerto fue de 0.3155 minutos. El factor de capacidad, calculado según lo descrito en los antecedentes, fue mayor a 2 en todos los casos.

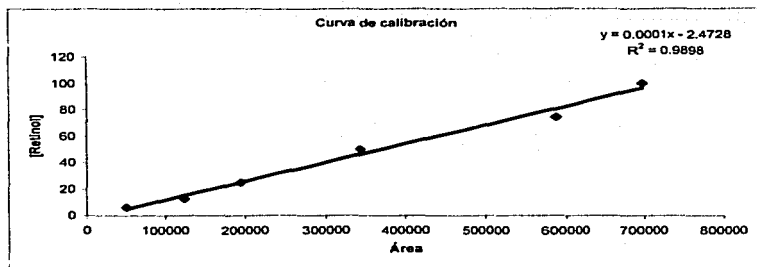
Cuadro No. 16 Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=5) de los tiempos de retención generados por una curva estándar de retinol

Concentración de retinol ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Tiempo de retención $\pm$ D.S.	% C.V.
6.25	$1.545 \pm 4.38 \times 10^{-3}$	0.28
12.5	$1.540 \pm 4.02 \times 10^{-3}$	0.26
25	1.533 ± 0.00	0.00
50	1.533 ± 0.00	0.00
75	$1.534 \pm 4.02 \times 10^{-3}$	0.26
100	1.533 ± 0.00	0.00

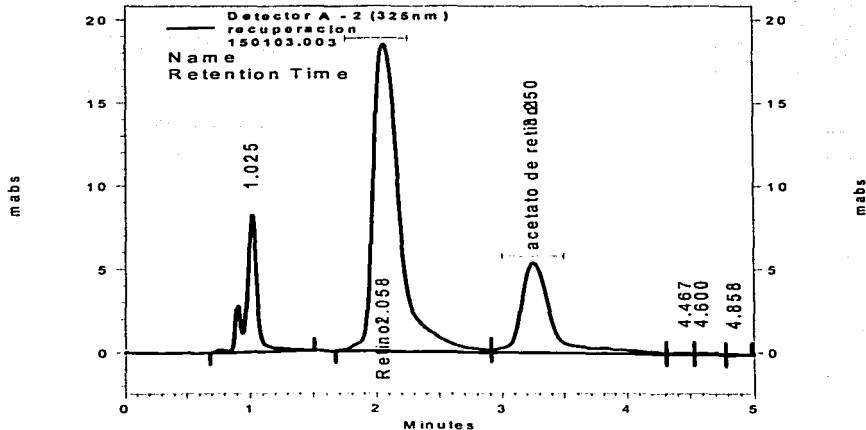
Precisión y linealidad del sistema

En la gráfica No. 3 se presenta la curva patrón del retinol en el cuál se puede ver que el aumento del área del pico es proporcional al aumento de concentración y la curva es lineal cuando la concentración va desde $6.25\mu\text{g}/100\text{ml}$ hasta $100\mu\text{g}/100\text{ml}$. En la gráfica No. 4 se muestra el cromatograma del estándar de retinol con acetato de retinol como estándar interno.

Gráfica No. 3 Curva de calibración para el retinol.



Gráfica No.4 Cromatograma del estándar de retinol con acetato de retinol como estándar interno.



En el cuadro No. 17 se encuentran los resultados obtenidos de inyectar seis curvas patrón, tres hechas un días y las otras tres al día siguiente, evaluándose la precisión del sistema, se observa que el coeficiente de variación en las respuestas obtenidas es menor del 5%, lo cual cumple con el criterio de aceptación, y en el cuadro No. 18 se muestran los resultados obtenidos durante la elaboración de las curvas de calibración del tipo: $\text{respuesta} = f(\text{concentración})$ obteniéndose valores de $r^2 > 0.98$ en todos los casos.

Cuadro No. 17 Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=6) de la respuesta generada por la inyección de 6 curvas patrón

Concentración de retinol ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Respuesta	% C.V.
9.375	0.81 ± 0.026	3.22
18.75	1.52 ± 0.028	1.849
37.5	2.92 ± 0.069	2.35
75	5.47 ± 0.172	3.15
93.75	6.52 ± 0.164	2.51

Respuesta = Relación de áreas retinol / acetato de retinol

Cuadro No. 18 Linealidad del sistema Curvas de calibración de la respuesta (relación de áreas) en función de la concentración.

Curva No.	$y = m x + b$	r^2
1	$0.0699 x + 0.227$	0.999
2	$0.0680 x + 0.289$	0.998
3	$0.0680 x + 0.294$	0.980
4	$0.0692 x + 0.200$	0.999
5	$0.0674 x + 0.260$	0.998
6	$0.0640 x + 0.321$	0.993

Recuperación del método

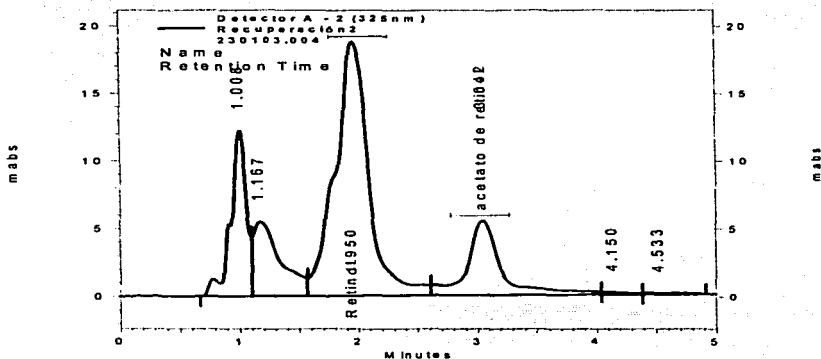
En esta parte se compararon las áreas obtenidas del estándar solo y en suero, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro No. 19, en donde se observa que los valores de recobro son mayores del 70% en todos los casos, cumpliendo con el criterio de aceptación.

Cuadro No. 19 Valores de recobro de retinol después de la recuperación

Concentración de retinol ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Área estándar	Área suero + estándar	% de Recobro
9.375	84795	71761	84.63
18.75	161603	142767	88.34
37.5	272556	237604	87.18
75	566952	438934	77.42

En la gráfica No. 5 se tiene el cromatograma del retinol en suero con su estándar interno, obtenido después de la extracción, en este se puede observar que el pico de retinol se pega con el pico del frente de disolvente.

Gráfica No. 5 Cromatograma de retinol y su estándar interno en suero.



Durante la realización de la validación para cuantificar retinol por HPLC se presentaron una serie de problemas que dificultaron dicha validación, dentro de los cuales cabe mencionar el problema de la columna cromatográfica, se tuvieron problemas con ésta debido a que se empezó a desempacar la sílice trayendo como consecuencia que se tapara el equipo, ensuciándolo y que subiera la presión a más de 400kg, ocasionando que el equipo se parara automáticamente, se pensó que se debía a que ya había terminado la vida útil de la columna. Otro de los problemas fue que al analizar suero, en el cromatograma los picos de frente de solvente y el del retinol salían pegados, esto debido

Resultados y Discusión

a los sucio de la muestra, por lo que se procedió a centrifugar y filtrar la muestra por medio de acrodiscos. Fue así como se eliminó dicho problema. También se encontró que había una gran variación en las áreas del estándar interno al analizarse en la matrices, es decir, el estándar interno parecía funcionar solo en soluciones estándar, lo cual provocaba un valor muy alto del coeficiente de variación.

Ante la imposibilidad de resolver este problema dentro de un tiempo razonable, se decidió ya no terminar la validación, ya que se cree que con los resultados que se tienen hasta ahora se puede llegar a tener una conclusión con respecto a lo ocurrido en este procedimiento experimental.

VI. CONCLUSIONES

- El crecimiento de los animales en estudio no se vio afectado por la adición en exceso de vitamina A y hierro, sino que dependió únicamente de la cantidad de proteína.
- El valor de REP tampoco se afectó al adicionar vitamina A y hierro en la dieta hipocalórica, hipoproteínica.
- El nivel de hemoglobina encontrado en las ratas con diferentes tratamientos está dentro de los valores normales aceptables.
- La concentración tan alta de hierro en los órganos de los animales con una dieta suplementada con vitamina A y hierro demuestran que efectivamente hubo una acumulación excesiva de este mineral, aunque no se pudo demostrar si éste produjo efectos adversos en los animales.
- Se logró establecer las condiciones de trabajo para la determinación de la actividad enzimática de las disacaridasas.
- No hubo diferencia significativa en la concentración de proteína en los animales con diferentes tratamientos, lo cuál era de esperarse pues la homeostasis de los animales se mantuvo.
- El nivel de la actividad de la lactasa tiene una tendencia a disminuir, pero no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos
- El nivel de la actividad enzimática de la maltasa y sacarasa aumentan en comparación a las ratas del lote control, comportamiento que en trabajos anteriormente realizados se había visto.
- Se lograron establecer las condiciones de trabajo para cuantificar el retinol por HPLC, pero no se pudo validar el método de análisis.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Bellamy, C., *Estado Mundial de la Infancia 1998*, Tema: Nutrición, Nueva York: UNICEF; 1998
2. De Onis, M., Monteiro, C., Akre, J., Clugston, G., *The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth*. WHO Bull OMS, 71:703-712, 1993
3. Casnueva, E., Kaufer-Horwitz, M., Pérez-Lizaur, A., Arroyo, P., *Nutriología Médica*, Editorial Médica Panamericana, segunda edición, México, D.F., 213 – 238, 2001
4. Nichols, B., Dudley, M., Nichols, V., Putman, M., Avery, S., Fraley, J.K., Quaroni, A., Shiner, M., Carrazza, F., *Affects of malnutrition on expression and activity of lactase in children*. Gastroenterology, 112:742-751, 1997
5. Mejía, L.A., and Chew, F., *Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron*, Am. J. Clin. Nutr. 48:595-600, 1988
6. Larysse, M., García-Casal, M.N., Solano, L., Barón, M.A., Arguello, F., Llovera, D., Ramírez, J., Leets, I., Tropper, E. *New property of vitamin A and β -carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption*. Archivos Latinoamericanos de nutrición, 50(3):243-248, 2000
7. Hackler, R., *Methods for measuring protein quality: a review of bioassay procedures*, Cereal Chemists, 54(4):984-995, 1977
8. Zigler, E. E., Filer, L.J. Jr., (Editores) *Present Knowledge in Nutrition*, ILSI, 7ª edición, Washington D.C., 33-43, 67-86, 109-117, 1996.
9. Guyton, A., *Tratado de Fisiología Médica*, Ed. Interamericana Mc. Graw Hill, México, D.F., 776-783, 1989.
10. Brody, T., *Nutritional Biochemistry*, Academic Press, Inc., Nueva York, 85-105, 1994.
11. Devlin, Thomas, M., *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas*, tomo II, Ed. Reverte S.A., 2ª edición, México, D.F., 1157-11181, 1991.

12. Semenza, G., *Handbook of Physiology*, Section 6, Alimentary Canal. Vol. 5, Bile, Digestion, Ruminal Physiology, American Physiology Society, Ed. Waverly Press, Nueva York, 2543-2560, 1968
13. Donald, S., McLaren, Martín, Frigg., *Guía de SIGHT AND LIFE sobre la Vitamina A en los Estados de Salud y Enfermedad*, 2ª edición, 2002
14. Castrejón, H.V., Ortega, P., Díaz, M.E., Amaya, D., Gómez, G., Ramos, M., Alvarado, M.V., Urieta, J., *Prevalencia de deficiencia subclínica de vitamina A y desnutrición en niños marginales de Maracaibo-Venezuela*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 51(1):25-31, 2001
15. Informe de la reunión. *Taller celebrado en la Isla de Margarita de 15 al 20 de marzo de 1994. La alimentación del niño menor de 6 años en América Latina*. Bases para el desarrollo de Guías de Alimentación. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 44(3):176-197, 1994
16. Hayes, K.C. & Hegsted, D.M., *Toxicity of the vitamins*. In Toxicants Occurring Naturally in Foods, p 235-253. NAS, Washington, D.C. 1973
17. Braithwaite, A., Smith, F.J., *Chromatographic Methods*, Ed. Chapman & Hall, Londres, 1-2, 212-290, 1985.
18. Willard, Hobart H., Merrit, Lynne, Jr., *Instrumental Methods of Analysis*, Ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, 580-654, 1988.
19. Skoog, Douglas, A., Holler, F., James., *Principios de Análisis Instrumental*, Ed. McGraw Hill, 4ª edición, México, 785-810, 2001.
20. Departamento de Química Analítica. *Química Analítica Instrumental II*, Manual de Laboratorio., PAPIME. Facultad de Química, UNAM, México, 41-44, 2002/1
21. García, A., Sobreón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara, A., Chárvet, A., Mota, R., Garzón, A., *Guía de Validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.*, 2ª edición, México 4, 8-11, 19-38, 44, 51, 55-86, 2002.

22. Cunningham, L., Blanco, A., Rodríguez, S., Ascencio, M., *Prevalencia de la anemia, deficiencia de hierro y folatos en niños menores de siete años*. Costa Rica, 1996, Archivos latinoamericanos de Nutrición, 51(1):37-41, 1996
23. Klaassen, C.D., Arndur, M.O., Doull, J., *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poissons*, Macmillan Publishing Company, 3ª edición, Nueva York, 613-614, 1986
24. Brody, Tom., *Nutritional Biochemistry*, Ed. Academic Press Inc., 1ª edición, EUA, 527-545, 1994
25. Bloem, M.W., Wedel, M., Egger, R.J., Speek, A.J., Schrijver, J., Saowakontha, S., Schreurs, W., *Iron metabolism and vitamin A deficiency in children in Northeast Thailand*, Am J Clin Nutr, 50:332-338, 1989
26. Hodges, R.E., Sauberlich, H.E., Canham, J.E., Wallace, D., Rucker R.B., Mejia, L.A., Mohanram, M., *Hematopoietic studies in vitamin A deficiency*. Am. J. Clin. Nutr., 31:876-885, 1978
27. Beal, V., *Nutrición en el ciclo de vida*, Ed. Limusa, México, D.F., 16-29, 1994
28. Lloyd, L., Mc Donald, B., Crampton, E., *Fundamentos de Nutrición*, Ed. Acribia, Zaragoza, 3-7, 282-318, 360-383, 1982
29. Osborne, T.B., Mendel, L.B., Ferry, E.L., *A Method of Expressing Numerically the Growth Promoting Value of Proteins*, J. Biol. Chem., 37:223-229, 1919
30. AOAC, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*, Ed. W. Horwitz, 12ª edición, Washington D.C., 1975.
31. Carmona, A., Borgudd, L., Borges, G., Levy-Benshimol, A., *Effect of black bean tannins on in vitro carbohydrate digestion and absorption*, Nutr Biochem, 7:445-450, 1996
32. Dahlqvist, A., *Method for assay of intestinal disaccharidases*, Anal Biochem, 7:18-25, 1964
33. Asp N.G., Dahlqvist A., *Human small intestine betaglucosidases: Specific assay of three different enzymes*. Anal Biochem, 45:527-538, 1972
34. Jeffrey, Clymer., *Citric Buffer Calculation*, w3.one.et/~jwcllymer/ctf.html., Versión 1, 1997., Buscador rmpelado: www.yahoo.com., Citado el día 4 de Septiembre del 2000.

35. Trinder, P., *Glucose Measurement with Glucose-oxidase-peroxidase Reagent*. Ann Clin Biochem., 7(3), 1994
36. Bergmeyer, H.U., (editor en jefe) *The Lowry Method, Methods of enzymatics analysis*, Editores Jergen, Bergmeyer, & Marianne Graßl, tercera edición , Wheinheim, Alemania, 11:88-91,1988
37. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.S., Farr, A. L., Randall, R. J. *Protein measurement with Folin Phenol reagent*, J Biochem 193:265-275, 1951
38. Vanzetti, G., *An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood* , J Lab & Clin Med 67:1,116-126, 1966
39. Sánchez, Nava, Marina., *Actualidades arqueológicas* Revista de estudiantes de arqueología de México, 15-16 noviembre 1997-febrero 1998
40. Matissek, R., Schenepel, F.M., Steiner, G., *Análisis de los alimentos , fundamento-método-aplicaciones*, 1ª edición, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 234-235, 1998
41. Furr, H.C., Tanumihardjo, S.A., Olson, J.A. *Training Manual for Assesing Vitamin A Status By Use Of The Modified Dose Response And The Relative Dose Response Assays*. Office of Nutrition, Bureau for Research and Development. Washington, D.C., 1992
42. Guyton, A., *Tratado de Fisiología Médica*, Ed. Interamericana McGraw Hill, 6ª edición, EUA, 370-379, 1992
43. Firmansyah, A., Swandito, I., Penn, D., Lebenthal, E., *Biochemical and Morphological Changes in the digestive Tract of Rats After Prenatal and Postnatal Malnutrition*, Am. J. Clin. Nutr. 50:2, 261-268, 1989
44. Rossi, T.M., Lee, P.C., Young, C.M., Lerner, A., & Lebenthal, E., *Effect o Nutritional Rehabilitation on the Development of Intestinal Brush Border Disaccharidases of Postnatally Malnourished Weanling Rats*, Pediatric Research. 20:8, 793-797, 1986