



Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TESIS DOCTORAL

**ESTABILIDAD DE VITAMINAS, VIDA COMERCIAL Y
BIOACCESIBILIDAD DE FOLATOS – HIERRO EN FÓRMULAS
INFANTILES DE CONTINUACIÓN Y CRECIMIENTO**

Fernando Romero Braquehais

Murcia 2008

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. LA ALIMENTACIÓN INFANTIL	5
1.1. Aspectos generales de la alimentación infantil.....	5
1.2. La lactancia materna.....	6
1.3. Alimentación en la primera infancia.....	7
2. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DEL HIERRO EN LA INFANCIA	14
2.1. Nutrición y metabolismo del hierro.....	17
2.1.1. Absorción del hierro.....	17
2.1.2. Regulación de la absorción del hierro.....	21
2.2. Requerimientos fisiológicos del hierro durante el crecimiento.....	22
3. ANEMIA, DEFICIENCIA EN HIERRO Y ANEMIA DEFICIENTE EN HIERRO	23
3.1. Anemia, un problema de salud pública.....	23
3.2. Deficiencia en hierro y anemia deficiente en hierro.....	24
4. ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN PARA PREVENIR LA DEFICIENCIA EN HIERRO	25
4.1 Suplementación.....	25
4.2. Diversificación de la dieta.....	26
4.3. Enriquecimiento.....	28
5. BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO Y SU VALORACIÓN	31
5.1. Incorporación a la hemoglobina.....	31
5.2. Monitorización fecal.....	32
5.3. Recuento corporal.....	33
5.4. Aparición/Desaparición en el plasma.....	33
5.5. Repleción de la hemoglobina.....	33
6. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LOS FOLATOS	35
6.1. Estructura química y nomenclatura.....	35
6.2. Los folatos en la salud humana.....	38
6.3. Metabolismo de los folatos.....	40
6.3.1. Absorción.....	40
6.3.2. Transporte.....	41
6.3.3. Excreción.....	42
6.4. Enfermedades relacionadas con la deficiencia en folatos.....	43
6.4.1. Enfermedades cardiovasculares.....	43
6.4.2. Anemia megaloblástica.....	43
6.4.3. Defectos del tubo neural.....	45
6.5. Valoración del contenido de folatos en los alimentos.....	45
6.5.1. Métodos analíticos.....	45
6.5.1.1. Método microbiológico.....	45
6.5.1.2. Ensayo de fijación de la proteína marcada con radioactividad.....	46
6.5.1.3. Método cromatográfico.....	46
6.5.2. Pretratamiento de las muestras.....	47
6.6. Biodisponibilidad de folatos en la dieta.....	48
6.6.1. Métodos de determinación de la biodisponibilidad de folatos.....	51
6.6.1.1. Métodos <i>in vivo</i>	52
6.6.1.2. Métodos <i>in vitro</i>	52
6.6.1.2.1. Modelo dinámico gastrointestinal <i>in vitro</i> TIM® (INO <i>In vitro</i> Model).....	53
7. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LAS VITAMINAS EN LA INFANCIA	53
7.1. Vitaminas hidrosolubles.....	55
7.1.1. Tiamina o Vitamina B1.....	55

7.1.2. Riboflavina o Vitamina B2.....	55
7.1.3. Niacina o Vitamina B3.....	56
7.1.4. Ácido Pantoténico o Vitamina B5.....	56
7.1.5. Piridoxina o Vitamina B6.....	56
7.1.6. Cobalamina o Vitamina B12.....	57
7.1.7. Ácido ascórbico o Vitamina C.....	59
7.1.8. Biotina o Vitamina B8.....	60
7.2. Vitaminas Liposolubles.....	60
7.2.1. Vitamina A.....	60
7.2.2. Vitamina D.....	61
7.2.3. Vitamina E.....	61
7.2.4. Vitamina K.....	62
8. PREDICCIÓN DE LA PÉRDIDA DE VITAMINAS. MODELO CINÉTICO-MATEMÁTICO.....	62
8.1. Reacción de “orden cero” en la cinética de deterioro de los alimentos.....	65
8.2. Reacción de “orden uno” en la cinética de deterioro de los alimentos.....	65
8.3. Efecto de la temperatura.....	66
8.3.1. Ecuación de Arrhenius.....	66
8.3.1.1. Método de regresión lineal.....	67
8.3.1.2. Método de regresión no lineal.....	67
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	69
2. MATERIALES.....	72
2.1. Leche de crecimiento.....	72
2.2. Dietas AIN93G para roedores.....	73
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA.....	74
3.1. ESTUDIO I.....	74
3.1.1. Estufas de incubación.....	74
3.1.2. Determinación de Riboflavina, Piridoxina, Nicotinamida y Tiamina por HPLC.....	74
3.1.3. Determinación de vitamina B12 por microbiología.....	78
3.1.4. Determinación de biotina y ácido pantoténico por microbiología.....	78
3.1.5. Determinación de Ácido ascórbico por HPLC.....	79
3.1.6. Determinación de vitamina A y E.....	80
3.1.7. Determinación de vitamina D.....	82
3.1.8. Estudio cinético de degradación de las vitaminas.....	84
3.2. ESTUDIO II.....	85
3.2.1. Determinación de la bioaccesibilidad dinámica de folatos por el modelo TIM.....	85
3.2.2. Cuantificación de folatos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	89
3.3. ESTUDIO III y IV.....	92
3.3.1. Animales.....	92
3.3.2. Pauta de recogida de datos y toma de muestras.....	94
3.3.2.1. Ingesta de alimento, peso corporal, recogida de heces y orina.....	94
3.3.2.2. Anestesia y disección.....	95
3.3.2.3. Preparación de las muestras.....	96
3.3.3. Obtención de cenizas y determinación del contenido mineral.....	97
3.3.4. Determinación de parámetros hematológicos.....	98
3.3.5. Determinación de parámetros bioquímicos.....	99
3.3.6. Cálculos de la evaluación del balance mineral.....	100
3.3.7. Índices de la biodisponibilidad del hierro.....	100
3.3.7.1. Porcentaje de biodisponibilidad del hierro.....	100
3.3.7.2. Valor de la biodisponibilidad relativa (VBR).....	101
3.3.8. Cuantificación de folatos en hígado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	101

3.3.9. Determinación de folatos en suero y glóbulos rojos.....	105
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	110
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
ESTUDIO I.....	113
1. ESTABILIDAD DE LAS VITAMINAS EN UNA LECHE DE CRECIMIENTO LÍQUIDA.....	113
1.1. Vitaminas hidrosolubles.....	113
1.1.1. Efecto de la temperatura y periodo de almacenamiento.....	113
1.1.1.1. Tiamina.....	114
1.1.1.2. Riboflavina.....	115
1.1.1.3. Niacina.....	116
1.1.1.4. Ácido pantoténico.....	117
1.1.1.5. Piridoxina.....	119
1.1.1.6. Ácido fólico.....	119
1.1.1.7. Cianocobalamina.....	120
1.1.1.8. Vitamina C.....	120
1.1.1.9. Biotina.....	121
1.2. Vitaminas liposolubles.....	122
1.2.1. Efecto de la temperatura y periodo de almacenamiento.....	122
1.2.1.1. Vitamina A.....	122
1.2.1.2. Vitamina D.....	125
1.2.1.3. Vitamina E.....	125
1.3. Estudio cinético de degradación de las vitaminas.....	126
1.3.1. Vitamina C.....	126
1.3.2. Vitamina B8.....	129
1.3.3. Vitamina A.....	132
1.3.4. Vitamina D.....	136
1.3.5. Vitamina E.....	139
ESTUDIO II.....	142
2. BIOACCESIBILIDAD DE FOLATOS EN FÓRMULAS INFANTILES LÍQUIDAS ENRIQUECIDAS CON ÁCIDO FÓLICO Y (6S)-5-MTHF.....	142
ESTUDIO III.....	148
3. BIODISPONIBILIDAD DEL BISGLICINATO FERROSO (BF) EN EL ENRIQUECIMIENTO DE UNA LECHE DE CRECIMIENTO LÍQUIDA. MÉTODO DE LA EFICIENCIA DE REGENERACIÓN DE LA HEMOGLOBINA (ERH).....	148
3.1. Crecimiento y consumo de alimento.....	148
3.2. Balance mineral.....	149
3.3. Biodisponibilidad del hierro.....	151
3.4. Índices hematológicos y bioquímicos.....	154
3.5. Almacenamiento del hierro.....	159
ESTUDIO IV.....	162
4. INTERACCIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE HIERRO-FOLATOS AÑADIDAS A UNA LECHE DE CRECIMIENTO LÍQUIDA EN UNA DEFICIENCIA COMBINADA DE HIERRO-FOLATO SOBRE UN MODELO DE DEPLECIÓN-REPLECIÓN EN RATAS.....	162
4.1. Crecimiento y consumo de alimento.....	162
4.2. Balance mineral.....	164
4.3. Biodisponibilidad de los diferentes compuestos de hierro.....	166
4.4. Biodisponibilidad de los diferentes compuestos de folato.....	168
4.5. Índices hematológicos y bioquímicos.....	171
4.6. Almacenamiento del hierro.....	177
VI. CONCLUSIONES.....	181
VII. RESUMEN.....	183
VIII. SUMMARY.....	185
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	187

ÍNDICE DE TABLAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Composición de la leche materna y la leche de vaca.....	7
Tabla 2. Composición básica para preparados lactantes	11
Tabla 3. Composición básica para preparados de continuación	12
Tabla 4. Ingesta diaria de referencia (DRI) en las distintas etapas de la vida.....	23
Tabla 5. Límites de hemoglobina utilizados para definir la anemia, basadas en las recomendaciones de WHO/UNICEF/UNU.....	24
Tabla 6. Definiciones propuestas para valorar la biodisponibilidad del hierro.....	31
Tabla 7. Métodos para valorar la biodisponibilidad del hierro.....	31

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 8. Composición centesimal de la leche de crecimiento	72
Tabla 9. Componentes nutritivos (valores medios/100 ml).....	72
Tabla 10. Composición del mix de vitaminas de las diferentes leches empleadas en los distintos estudios.....	72
Tabla 11. Composición del mix de minerales de las diferentes leches empleadas en los distintos estudios.....	73
Tabla 12. Composición de las diferentes dietas utilizadas en el ensayo <i>in vivo</i>	74

ESTUDIO I

Tabla 13. Preparación de la recta multipatrón.....	76
Tabla 14. Linealidad y rango.....	77
Tabla 15. Precisión.....	77
Tabla 16. Límite de detección y cuantificación.....	77

ESTUDIO III-IV

Tabla 17. Condiciones instrumentales establecidas para la determinación del hierro.....	98
Tabla 18. Concentraciones de los patrones utilizadas, ecuación de la recta de calibrado y coeficiente de linealidad (R^2) para la recta.....	98
Tabla 19. Precisión intra e interensayo de los ensayos por fluorimetría a tiempo resuelto para los folatos.....	108

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO I

Tabla 20. Concentración de las vitaminas hidrosolubles almacenadas a diferentes temperaturas durante un periodo de tiempo de 9 meses.....	118
Tabla 21. Concentración de las vitaminas liposolubles almacenadas a diferentes temperaturas durante un periodo de tiempo de 9 meses.....	124
Tabla 22. Constante de velocidad (K), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina C y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.....	128
Tabla 23. Constante de velocidad (K), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina B8 y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.....	131
Tabla 24. Constante de velocidad (K), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina A y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.....	134
Tabla 25. Constante de velocidad (K), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina D y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.....	137
Tabla 26. Constante de velocidad (K), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina E y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.....	140

ESTUDIO II

Tabla 27. Contenido de folatos en las leches de crecimiento líquidas enriquecidas con AF y MF en el dializado yeyunal e ileal.....	142
Tabla 28. Contenido de folatos en las leches de crecimiento líquidas enriquecidas con AF y MF en el liberado ileal y excretado.....	143
Tabla 29. Porcentaje de recuperación del contenido de folatos del dializado yeyunal, ileal, liberado ileal y excretado en las leches de crecimiento enriquecidas con AF o MF entre las 0-5 horas del modelo gastrointestinal <i>in vitro</i>	146

ESTUDIO III

Tabla 30. Crecimiento e ingesta total de alimento durante el periodo de balance de 28 días.....	148
--	-----

Tabla 31. Balance del hierro en ratas anémicas alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes fuentes de hierro durante 28 días.....	150
Tabla 32. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH) en ratas anémicas alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes compuestos de hierro (SF o BF) durante los 28 días de repleción.....	152
Tabla 33. Diagnóstico de la anemia deficiente en hierro en ratas.....	154
Tabla 34. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con una leche de crecimiento líquida enriquecida con sulfato ferroso (SF) o bisglicinato ferroso (BF). Los resultados se expresan en mg/g peso seco.....	160
ESTUDIO IV	
Tabla 35. Crecimiento e ingesta de alimento durante el periodo de balance de 28 días.....	163
Tabla 36. Balance del hierro de ratas deficientes en hierro-folato alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes fuentes de hierro y folato durante 28 días.....	164
Tabla 37. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH) de ratas deficientes en hierro-folato alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes fuentes de hierro y folato durante 28 días.....	166
Tabla 38. Estatus de folatos en ratas deficientes en hierro-folato alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con SF o BF y AF o MF durante un periodo de 28 días.....	169
Tabla 39. Concentración de hierro en diferentes piezas anatómicas de las ratas alimentadas con una leche de crecimiento líquida enriquecida con SF+AF/MF o BF+AF/MF. Los resultados se expresan en mg/g peso seco...	178

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Transporte del hierro a través del epitelio intestinal.....	19
Figura 2. Estructura del bisglicinato ferroso.....	30
Figura 3a. Estructura del ácido fólico.....	35
Figura 3b. Diferentes estructuras de los folatos.....	36
Figura 4. Estructura química de la sal cálcica del L-5-MTHF.....	38
Figura 5. Componentes principales del ciclo bioquímico de los folatos.....	40
Figura 6. Mucosa yeyunal normal que muestra las vellosidades intestinales.....	40
Figura 7. Hidrólisis y absorción de folatos.....	41

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 8. Esquema del diseño experimental.....	71
---	----

ESTUDIO II

Figura 9. Esquema del modelo gastrointestinal <i>in vitro</i> (TIM).....	88
Figura 10. Esquema del periodo de depleción durante el estudio <i>in vivo</i> en ratas.....	93
Figura 11. Esquema del periodo de repleción durante el estudio <i>in vivo</i> en ratas.....	94
Figura 12. Distribución de los estándar y muestras en la placa de titulación.....	108
Figura 13. Exactitud de la concentración de folatos valorados por dilución de dos muestras de plasma de rata con elevado contenido en folato.....	109

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO I

Figura 14. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina C en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	127
Figura 15. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina C en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	127
Figura 16. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina C en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.....	129
Figura 17. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina B8 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	130
Figura 18. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina B8 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	130
Figura 19. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina B8 en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.....	132
Figura 20. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina A en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	133
Figura 21. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina A en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	133
Figura 22. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina A en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.....	135
Figura 23. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina D3 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	136
Figura 24. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina D3 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	137
Figura 25. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina D3 en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.....	138
Figura 26. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina E en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	139
Figura 27. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina E en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.....	140
Figura 28. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina E en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.....	141

ESTUDIO II

Figura 29. Contenido de folatos en el dializado yeyunal a los 60, 120, 180 y 300 min, en las leches de crecimiento líquidas enriquecidas con AF y MF.....	143
Figura 30. Contenido de folatos en el dializado ileal a los 60, 120, 180 y 300 min, en las leches de crecimiento enriquecidas con AF y MF.....	144

Figura 31. Contenido de folatos en el liberado ileal a los 60, 120, 180 y 300 min, en las leches de crecimiento enriquecidas con AF y MF.....	145
ESTUDIO III	
Figuras 32. Incremento en las concentraciones de VCM (a) , HCM (b) y CHCM (c) en ratas anémicas durante la administración de los diferentes compuestos de hierro, SF y BF.....	155
Figuras 33. Efecto de la ingesta de leche de crecimiento enriquecida con SF o BF sobre el HS (a), CTFH (b), ST (c) y Ferritina (d), en ratas anémicas durante un periodo de 28 días.....	157
ESTUDIO IV	
Figuras 34. Incremento en las concentraciones de VCM (a), HCM (b) y CHCM (c) en ratas deficientes de hierro-folato durante la administración de los diferentes compuestos de hierro (SF y BF) y folato (AF y MF).....	174
Figuras 35. Efecto de la ingesta de la leche de crecimiento enriquecida con SF+AF/ BF o BF+AF/MF, sobre el HS (a), CTFH (b), ST (c) y Ferritina (d), en ratas deficientes en hierro-folato durante un periodo de 28 días.....	176

ABREVIATURAS

%.....	Porcentaje	EAR.....	Estimated Average Requirements
°C.....	Grados centígrados	EDTA.....	Ethylenediaminetetraacetic acid
°K	Grados Kelvin	EFSA	European Food Safety Authority
%R	Porcentaje Recuperado	ERH.....	Eficiencia de la Regeneración de la Hemoglobina
[6S]-5-MTHF.....	Sal cálcica del 5-MTHF	ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
~	Aproximadamente	FAD	Flavin adenosina dinucleótido
±.....	Más menos	FAO.....	Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
µg.....	Microgramos	Fe ⁺²	Hierro ferroso
µm.....	Micrómetros	Fe ⁺³	Hierro férrico
µmol.....	Micromoles	FeSO ₄ * 7H ₂ O...	Sulfato ferroso heptahidratado
µm ³	Micrómetros cúbicos	FMN	Flavin mononucleótido
5-MTHF.....	5-metiltetrahidrofólico	FTHF	Formal Tetrahidrofolato
AA.....	Absorción Aparente	g.....	gramos
AAP.....	Asociación Americana de Pediatría	H	Hidrógeno
ABC.....	Área Bajo la Curva	h.....	Hora
ADN.....	Ácido Desoxirribonucleico	H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
AI.....	Adequate Intake	Hb.....	Hemoglobina
AIN.....	American Institute of Nutrition	HCM.....	Hemoglobina Corpuscular Media
ALAS.....	ácido δ-aminolevulínico sintetasa	HCP1.....	Heme Carrier Protein 1
AF.....	Ácido fólico	-HCO	Grupo formil
AOAC.....	Association of Oficial Analytical Chemistry	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ARN.....	Ácido Ribonucleico	Hct.....	Hematocrito
BF.....	Bisglicinato ferroso	HNO ₃	Ácido nítrico
BNF.....	British Nutrition Foundation	HS.....	Hierro Sérico
BOE	Boletín Oficial del Estado	IDR.....	Ingesta Diaria de Referencia
BSA	Bovine Serum Albumin	ILSI.....	Internacional Life Sciences Institute
Ca.....	Calcio	INACG.....	International Nutritional Anemia Consultative Group
cc.....	Centímetros cúbicos	IOM.....	Institute of Medicine
Cd ⁺²	Cadmio	IREG-1.....	Iron Regulated Transporter 1
CDR.....	Cantidad Diaria Recomendada	K.....	Constante de velocidad
CFHI	Capacidad de Fijación del Hierro Insaturado	Kcal	Kilocalorías
-CH ⁺	Grupo metenil	KDa.....	KiloDaltons
-CH ₂	Grupo metileno	Kg.....	Kilogramos
-CH ₃	Grupo metil	Kj	Kilojulios
CH ₃ COOH.....	Ácido acético glacial	l.....	Litros
CHCM.....	Concentración de la Hemoglobina Corpuscular Media	L-MTHF	L-Metilfolato
Co ⁺²	Cobalto	LSRO	Life Science Research Office
CTFH.....	Capacidad Total de Fijación del Hierro	MF	Metafolin
DCT1.....	Divalent Cation Transporter 1	mg.....	Miligramos
Dcytb.....	Duodenal cytochrome b	MI.....	Micronutrient Initiative
DHF	Dihidrofólico	min.....	Minutos
DHFR	Dihidrofolato Reductasa	ml	Mililitro
dl	decilitro	mm.....	Milímetros
DMT1.....	Divalent Metal Transporter 1	Mn ⁺²	Manganeso
DRI.....	Dietary Reference Intake	MTHFR	Metiltetrahidrofolato Reductasa
DTN	Defectos del Tubo Neural	MTP 1.....	Metal Transporter Protein 1
DTT.....	Ditiotreitól	Na.....	Sodio
Ea	Energía de activación	NaFeEDTA	Etilendiaminotetraacetato –sódico-férrico
EAA.....	Espectrofotometría de Absorción Atómica	NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
		ng.....	nanogramo

-NHCH	Grupo formimino
Ni ⁺²	Níquel
NIH	Nacional Institutes of Health
nm.....	Nanómetros
nmol.....	nanomoles
Nramp2.....	Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
p.....	Nivel de significación estadístico
pABA	p-aminobenzoato
Pb ⁺²	Plomo
pg.....	Picogramos
PGA	Ácido pteroilglutámico
ppm.....	Partes por millón
ps.....	Peso seco
Pte	Pteroato o ácido pterico
PUF	Proteína de unión al folato
R.....	Constante de los gases
r.....	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de regresión lineal
RBV.....	Relative Bioavailability Value
RDA.....	Recomended Dietary Allowances
RE	Equivalentes de Retinol
RDW	Red Distribution Width
rpm.....	Revoluciones por minuto
SCF	Scientific Committee for Food
SD.....	Sprague-Dawley
SF.....	Sulfato ferroso
ST.....	Saturación de la Transferrina
t	Tiempo
T ^a	Temperatura
TE	Equivalentes de Tocoferol
THF	Tetrahidrofólico
TIM	TNO In vitro Model
TPTZ.....	Tripiridiltriácina
UHT	Ultra High Temperature
UL.....	Tolerable Upper Intake Level
UNICEF.....	United Nations Children's Fund
UNU.....	United Nations University
VBR.....	Valor de la Biodisponibilidad Relativa
VCM.....	Volumen Corpuscular Medio
WHO.....	World Health Organization
Zn ⁺²	Zinc

INTRODUCCIÓN

La alimentación humana durante los primeros meses de vida tiene una gran importancia tanto en las fases tempranas del desarrollo como en su salud a largo plazo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la lactancia materna exclusiva es el alimento ideal para el recién nacido a término sano, desde el nacimiento hasta los seis meses de edad. Cuando la madre no puede amamantar a su hijo, las fórmulas infantiles comerciales constituyen la mejor alternativa como fuente de alimentación. El diseño de las fórmulas infantiles sigue como modelo la composición de la leche humana, aunque la tendencia creciente es además, buscar los efectos funcionales que proporciona. En la legislación europea (Directiva 2006/141/CE de la comisión de 22 de diciembre de 2006), se define a los «preparados para lactantes» o «fórmulas para lactantes» o «fórmulas de inicio» o «fórmula 1» como los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida. A los productos diseñados para sustituir a la leche materna o como parte de la alimentación del lactante por encima de los 4-6 meses, los denomina «preparados o fórmulas de continuación» (fórmulas 2). Posteriormente, se han diseñado las denominadas “fórmulas de crecimiento” o “fórmulas junior” (fórmulas 3) no sujetas a una legislación específica y diseñadas para servir como transición desde las fórmulas infantiles a la leche de vaca apta para el consumo que podemos encontrar en el comercio (Moreno-Villares y Galiano-Segovia., 2006).

Uno de los nutrientes esenciales en la alimentación infantil son las vitaminas. La dieta humana no siempre contiene la cantidad de vitaminas necesarias para el desarrollo y mantenimiento normal de las funciones corporales. Por esta razón, ciertos productos alimenticios son suplementados con vitaminas, especialmente aquellos dirigidos a la nutrición infantil. Además, el procesado de los alimentos y los largos periodos de almacenamiento de los mismos pueden conducir a las pérdidas de las vitaminas. Por tanto, el enriquecimiento con las vitaminas permite que se alcancen los requerimientos nutricionales de las fórmulas y otros alimentos infantiles (Zafra-Gómez y col., 2006). Para compensar estas pérdidas durante la fabricación y modificar la composición del producto para los requerimientos del recién nacido o niño de corta edad, las vitaminas son añadidas al final del proceso de producción. Aunque, las leches de los lactantes o niños de corta edad están diseñados a partir de la leche materna, su contenido en vitaminas generalmente es más elevado como medida de prevención. Además, estas leches generalmente no son consumidas inmediatamente después de su fabricación, y las vitaminas pueden estar afectadas por varios factores tales como el tipo de empaquetamiento y el tiempo y las condiciones de almacenamiento (exposición al oxígeno, luz e incremento de la temperatura) (Albalá-Hurtado y col., 2000a). Una de las herramientas más útiles en la predicción de la estabilidad de las vitaminas durante su temperatura y periodo de almacenamiento es el

estudio mediante el uso de una expresión general de la velocidad de reacción para la degradación cinética (Libuza y Riboh., 1982; Ramaswami y col., 1989; Van Boekel, 1996), y mediante la ecuación de Arrhenius, relacionar la velocidad de reacción de la degradación de la vitamina con la temperatura de almacenamiento.

Hoy en día, la mayoría de los preparados alimenticios en los lactantes y niños de corta edad están enriquecidos con hierro. El rápido crecimiento hace de los lactantes y los niños de corta edad un grupo de riesgo particular para la anemia deficiente en hierro. Las últimas estimaciones presentadas por la OMS establecieron que la prevalencia de anemia en los países en vías de desarrollo era de un 39% y en los países industrializados de un 20% (WHO, 2002). En poblaciones desarrolladas la alimentación exclusiva con leche materna previene la anemia deficiente en hierro durante la primera mitad de la infancia en lactantes sanos a término (Pisacane y col., 1995). Los niños de corta edad a término sanos alimentados con fórmula infantil no enriquecida con hierro rara vez desarrollan la anemia deficiente en hierro antes de los 4 meses de edad, pero presentan un mayor riesgo de padecerla que aquellos alimentados con leche materna después de esa edad (Pizarro y col., 1991; Moffatt y col., 1994). Por esta razón, la mayoría de las fórmulas infantiles son enriquecidas con hierro. Junto con el hierro, son esenciales otras vitaminas necesarias para la formación de los eritrocitos, estas son la vitamina B12 y el ácido fólico. Las deficiencias de hierro y folato son desordenes nutricionales prevalentes en todo el mundo y a menudo ocurren simultáneamente. La frecuente coexistencia de la deficiencia de estos dos nutrientes ha conducido a muchos investigadores a examinar si sus metabolismos están interconectados.

En general, el consumo de alimentos enriquecidos puede ser considerado como una alternativa o planteamiento complementario a incrementar la ingesta de folato y hierro. La leche puede ser un producto idóneo para el enriquecimiento de ambos nutrientes, como resultado de su elevado consumo. El bisglicinato ferroso es un compuesto que está aprobado por la OMS para el enriquecimiento de leches y productos lácteos líquidos, asegurando una elevada biodisponibilidad y por tanto mejora en la recuperación de un estado de anemia deficiente en hierro. Actualmente se está empezando a utilizar de forma alternativa al ácido fólico, la sal cálcica del 5-metiltetrahidrofolato ([6S]-5-MTHF) para el enriquecimiento de alimentos sólidos, semi-líquidos y líquidos, ya que presenta similares efectos beneficiosos a los obtenidos por el ácido fólico, pero con una mayor biodisponibilidad que éste. Estos dos compuestos aparecen como alternativas interesantes a las formas tradicionales (sulfato ferroso y ácido fólico) usadas en el enriquecimiento de productos de alimentación especial y por eso se han seleccionado para este trabajo.

OBJETIVOS

1. Evaluar la estabilidad de las vitaminas durante su vida comercial a diferentes temperaturas de almacenamiento en una leche de crecimiento líquida, así como los parámetros cinéticos de degradación de aquellas vitaminas que pudieran mostrar pérdidas durante los periodos de almacenamiento a diferentes temperaturas.
2. Determinar la bioaccesibilidad de folatos en una leche de crecimiento líquida enriquecida con [6S]-5-MTHF (Metafolin[®]) o ácido fólico mediante un modelo dinámico gastrointestinal *in vitro* (TIM[®] Model).
3. Comparar la biodisponibilidad del bisglicinato ferroso como compuesto de enriquecimiento en una leche de crecimiento líquida en relación a la del sulfato ferroso, mediante el método de la Eficiencia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH), usando el modelo de depleción-repleción del hierro en ratas de experimentación.
4. Comparar la biodisponibilidad del [6S]-5-MTHF con la del ácido fólico añadidos a una leche de crecimiento líquida en ratas deficientes en folato mediante la valoración de la respuesta de los folatos en plasma y en hígado. Además, observar la existencia de efecto entre las dos formas de folatos y los compuestos de hierro (bisglicinato ferroso y sulfato ferroso) cuando coexisten las dos deficiencias en hierro y folato, mediante un estudio de depleción-repleción en ratas de experimentación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LA ALIMENTACIÓN INFANTIL

1.1. Aspectos generales de la alimentación infantil

El adecuado suministro de los nutrientes a través de los alimentos en una equilibrada composición es incluso más importante para los niños de corta edad que para los niños y adultos sanos durante cualquier otro periodo de la vida. La rápida tasa de crecimiento en los niños de corta edad sanos nacidos a término les lleva a doblar su peso en solamente 4-5 meses después del nacimiento y presentar elevados requerimientos de energía y nutrientes por Kg de peso corporal. Además de alcanzar sus requerimientos en el mantenimiento, los niños de corta edad deben cubrir sus necesidades de energía y sustrato necesarios para la síntesis y deposición de nuevos tejidos.

Los elevados requerimientos metabólicos contrastan con la limitada capacidad de los niños de corta edad de compensar un suministro inadecuado de nutrientes debido a las disminuidas reservas corporales de nutrientes y a los inmaduros mecanismos homeostáticos. Por ejemplo, la actividad de algunas vías metabólicas y la capacidad renal para concentrar la orina es aún baja durante los primeros 3-4 meses de vida (Wharton y Scout, 1996; Koletzko, 2005). Los niños de corta edad pueden no ser capaces de sintetizar suficientes cantidades de ciertos sustratos considerados como no esenciales o dispensables, ya que la limitada capacidad de las vías de síntesis metabólicas específicas no siempre es suficiente para alcanzar los elevados requerimientos. Algunos nutrientes considerados no esenciales en los adultos y en los niños de más edad pueden llegar a ser indispensables para los niños de corta edad que serían suministrados en la dieta.

Además de las consecuencias inmediatas de la alimentación infantil sobre el crecimiento, composición corporal, salud y bienestar, un número de recientes estudios además han proporcionado indicaciones que la cantidad y calidad en el suministro de los nutrientes durante la infancia tiene importantes consecuencias a largo plazo en el desarrollo y función de los órganos, salud y riesgos de enfermedad así como en la habilidad cognitiva (Lucas, 1998).

Considerando el riesgo particular en los niños de corta edad a experimentar efectos adversos por las dietas con muy bajos o muy elevados nutrientes específicos (Fomon, 2001), y el hecho de que durante los primeros meses de vida, la única fuente de nutrientes para alcanzar los requerimientos dietéticos es la leche materna, especiales esfuerzos son necesarios para asegurar una adecuada composición dietética en los niños de corta edad.

1.2. La lactancia materna

El comité científico sobre alimentos de la comisión europea apoya la alimentación con lactancia materna como la forma ideal de alimentación en niños de corta edad nacidos a término (SCF/CS/NUT/IF/65 Final, 2003). De igual modo, la Asociación Americana de Pediatría (AAP), considera la leche materna como la elección preferida en la alimentación de todos los niños (APP Committee on Nutrition, 2004). Así mismo, se ha comprobado que los componentes de la leche humana no son intercambiables con los de otro alimento, por lo que se recomienda la leche humana como el alimento ideal para los neonatos a término (Hambraeus y col., 1975).

La leche humana desempeña un doble papel: contiene la mayor parte de los nutrientes que proporcionan los cofactores enzimáticos o sustratos para la energía, y los componentes estructurales y funcionales para el desarrollo de los niños que están madurando (McLaughlin y Campbell, 1999). Cada uno de los principales nutrientes está representado en la leche humana. Las proteínas aportan aminoácidos para el crecimiento, además se presentan en la forma de polipéptidos que facilitan la digestión (Goldman y Smith, 1973), la defensa del huésped (Klagsbrun, 1978) y otras funciones (Welsh y col., 1978). Las grasas proporcionan energía, pero algunas tienen propiedades antivirales (Wasserman, 1964). Los carbohidratos brindan energía y además pueden estimular la absorción de minerales (Mehta y col., 1982), modular el desarrollo de bacterias e impedir la fijación de bacterias seleccionadas a las células epiteliales de las vías respiratorias y digestivas que están expuestas a la leche humana durante el proceso de amamantamiento.

Investigaciones realizadas en países en vías de desarrollo y desarrollados en todo el mundo, incluyendo las poblaciones de clase media en los países desarrollados, han proporcionado fuertes evidencias de que la alimentación con leche humana descende la incidencia y/o severidad de un amplio rango de enfermedades infecciosas (Heinig MJ, 2001), incluyendo la meningitis bacteriana (Istre y col., 1985; Cochi y col., 1986), bacteriemia (Takala y col., 1989), diarrea (Bhandari y col., 2003; Kramer y col., 2003), infección en el tracto respiratorio (Blaymore Bier y col., 2002; Oddy y col., 2002; Bachrach y col., 2003; Oddy y col., 2003), enterocolitis necrotizante (Schanler, y col., 1999) e infección en el tracto urinario (Marild y col., 2004) entre otras.

Otros estudios sugieren que la alimentación con leche materna descende las tasas del síndrome de muerte infantil súbita en el primer año de vida (McVea y col., 2000; Alm y col., 2002; Horne y col., 2004) y una reducción en la incidencia de diabetes insulino-dependientes (Tipo 1) y no insulino-dependientes (Tipo 2) (Perez-Bravo y col; 1996; Pettit y col., 1997), linfoma, leucemia, y enfermedad de Hodgkin (Bener y col., 2001), sobrepeso y obesidad

(AAP, 2003; Arenz y col., 2004; Grummer-Strawn y col., 2004), hipercolesterolemia (Owen y col., 2002), y asma (Oddy y col., 2002; Chulada y col., 2003) en niños mayores y en adultos que fueron alimentados con leche materna, comparado con individuos que no fueron alimentados con leche materna.

Los recién nacidos que no pueden ser alimentados con leche materna o no la reciben, o para quienes la leche materna no está disponible, requiere sustituir la leche materna por otras formulas lácteas infantiles de elevada calidad durante los 4-6 meses de vida (WHO, 1986). Las actuales indicaciones de la OMS (WHO, 2001) y una reciente revisión sistemática sobre la alimentación con pecho muestra que, en general, la continuación exclusiva de la alimentación con pecho a los 6 meses de vida es aconsejable tanto en los países en vías de desarrollo como en los países industrializados. Después de los 6 meses de vida, la alimentación exclusiva con pecho no asegura la ingesta necesaria de calorías, proteínas, zinc y hierro, y de algunas vitaminas liposolubles (A y D). Por lo tanto, la introducción complementaria de alimentos sólidos cubre estas necesidades. Es necesario anotar que el uso de la leche de vaca se debe posponer hasta el final del primer año de vida, o incluso después del segundo año de vida, tanto en los recién nacidos alimentados con leche materna como a los alimentados con formula. Esto es debido al desequilibrio nutricional presente en la leche de vaca. La composición de la leche de vaca difiere ampliamente de la composición de la leche materna (Tabla 1), además podría ocasionar serios riesgos en los recién nacidos cuyos órganos no han alcanzado la completa madurez.

Tabla 1. Composición de la leche materna y la leche de vaca (por 100 ml)

	Leche materna	Leche de vaca
Energía (Kcal)	65	66
Proteína (mg/dl)	1.2	3.2
Lípidos (mg/dl)	3.7	3.7
Carbohidratos (mg/dl)	7	4.9

Datos parcialmente modificados de Jensen (1995).

Si la leche materna no está disponible, el uso de una formula infantil apropiada en el primer año de vida y una leche de continuación en el segundo año de vida ofrecerá una alternativa nutricional adecuada en relación a prevenir posibles deficiencias o excesos de nutrientes (Riva y col., 2007)

1.3. Alimentación en la primera infancia

La infancia constituye probablemente el período de vida con una mayor demanda nutricional, pues el peso corporal del niño se duplica entre el 4º y el 6º mes de vida y se triplica al finalizar el año (Milner, 1990). Por ello, los niños, desde un punto de vista dietético, constituyen uno de los segmentos más vulnerables de nuestra sociedad. La investigación

debe orientarse hacia una mejora de la salud y la calidad de vida de los niños, no sólo para la obtención de unos beneficios inmediatos sino para conseguirles una nutrición óptima (Splett y Story, 1991). Las decisiones con respecto a la alimentación del niño durante el primer año de vida suponen una oportunidad única e irrecuperable para alcanzar un crecimiento y desarrollo óptimo y una larga vida saludable (Johnson, 1997).

Según Bueno y Pérez (1986) y Tojo y col. (1987a), la alimentación que recibe el niño desde el nacimiento hasta el 2º año de edad se puede dividir en tres períodos:

1.- Período lácteo: se extiende desde el nacimiento hasta aproximadamente los cuatro y seis meses de edad. Al nacer el lactante presenta los reflejos de succión y deglución, pero aún no ha desarrollado la capacidad de digerir ciertas proteínas o de soportar cargas osmolares excesivas a nivel renal, siendo la leche el único alimento que puede tomar el niño (Casado de Frías y col., 1993). El alimento unánimemente reconocido como ideal durante este período de la vida es la leche materna. No obstante, en ocasiones la madre no puede alimentar al niño con la leche especialmente diseñada para él por la naturaleza. En estos casos la leche de vaca modificada, en preparaciones denominadas “fórmulas adaptadas” puede ser un buen alimento sustitutivo, puesto que trata de aproximarse al máximo a la composición de la leche materna (Martínez y Hernández, 1993).

2.- Período de transición o diversificación progresiva: este período está comprendido desde los seis meses al año de edad. Es la fase de introducción paulatina de alimentos no lácteos, de tal forma que no se altere el ritmo de maduración digestiva, renal y el desarrollo neuromuscular. Además, en esta fase el niño va a empezar a conocer los alimentos, a masticar y a distinguir las características organolépticas de los mismos (Cervera y col., 1993). La alimentación complementaria está representada principalmente por alimentos homogeneizados, granulados en pequeñas partículas que no son precisos masticar, o bien con una textura más gruesa y con mayores partículas para estimular la masticación del niño antes de tragar (FAO/OMS, 1989).

3.- Período de maduración digestiva: comprende desde el 1er hasta el 2º año de edad. Se produce una maduración fisiológica e inmunitaria que permitirá llegar a una diversificación completa de la alimentación. Los alimentos que se pueden administrar en esta fase son los mismos que en el adulto, aunque modificados en cuanto a su textura y condimentación (Cervera y col., 1993).

Pocas veces en la vida la dieta es tan monótona y tan continuada en el tiempo como en los primeros meses de vida. Así, el consumo de leche materna o de fórmula cinco ó seis veces al día durante cuatro, cinco o seis meses satisface las necesidades nutritivas del

lactante, pero prolongar este tipo de alimentación puede dar lugar a una disminución de algún nutriente, ya que a partir de los cuatro meses los requerimientos de nutrientes se ven cada vez menos cubiertos por una alimentación exclusivamente formada por leche (Lönnnerdal, 1989).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la lactancia materna exclusiva es la alimentación ideal desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad en el recién nacido a término sano. Cuando la madre no puede amamantar a su hijo, las fórmulas infantiles comerciales constituyen la mejor alternativa como fuente de alimentación. El diseño de las fórmulas infantiles sigue como modelo la composición de la leche humana aunque la tendencia creciente es a buscar, además, los efectos funcionales que proporciona.

En la legislación europea, Directiva 2006/141/CE de la comisión de 22 de diciembre de 2006 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE, se denominan «preparados para lactantes» o «fórmulas para lactantes» o «fórmulas de inicio» o «fórmula 1» y lo define como los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de estos lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada. A los productos diseñados para sustituir a la leche materna o como parte de la alimentación del lactante por encima de los 6 meses los denomina «preparados o fórmulas de continuación» (fórmulas 2) y los define como los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes cuando se introduzca una alimentación complementaria apropiada que constituyan el principal elemento líquido de una dieta progresivamente diversificada de estos lactantes. Posteriormente, se han diseñado las denominadas “fórmulas de crecimiento” o “fórmulas junior” (fórmulas 3) no sujetas a una legislación específica y diseñadas para servir como transición desde las fórmulas infantiles a la leche de vaca apta para el consumo que podemos encontrar en el comercio (Moreno-Villares y Galiano-Segovia., 2006). Las fórmulas para lactantes sanos, tal como las conocemos actualmente (menor contenido proteico, proteínas adaptadas, baja carga renal de solutos), comenzaron a producirse industrialmente en los años 50. A medida que se ha ido conociendo mejor las necesidades nutricionales del lactante, se ha ido modificando su composición (Fomon, 2001; Rivero-Urgell y col., 2005). En la Tabla 2 se representa la composición básica de preparados para lactantes.

Las fórmulas de continuación fueron desarrolladas en Francia en 1970 con el objetivo de reducir el extendido uso de la leche de vaca en los primeros meses de vida. Fueron diseñadas para ser usadas desde los 4-5 meses de edad. En el año 1970 se observó que la alimentación con leche materna raramente era continuada más allá de los 6 meses de vida. Además, el uso de la leche de vaca en el primer año de vida era considerada por entonces

inapropiada, ya que podría resultar en un desequilibrio nutricional, es decir, una ingesta excesiva de proteínas y ácidos grasos saturados y una insuficiente ingesta de hierro, cinc y ácidos grasos poliinsaturados (Riva y col., 2007). Estudios llevados a cabo en Estados Unidos (Lönnerdal, 1997) mostraron que una ingesta desequilibrada de calcio, fósforo y sodio en lactantes alimentados con leche de vaca está asociada con deficiencias anteriormente mencionadas en el periodo entre el sexto y duodécimo mes de vida. En general, retrasar la introducción de la leche de vaca hasta el final del primer año de vida parece jugar un papel fundamental en la prevención de la anemia deficiente en hierro (Sullivan, 1993).

A partir de esta edad, los mecanismos homeostáticos del organismo están lo suficientemente desarrollados como para permitir una mayor concentración de los nutrientes. La digestión, absorción, las enzimas que intervienen en el metabolismo intermediario y la función renal han alcanzado un grado de madurez suficiente para que el niño pueda recibir una fórmula menos compleja que la inicial. Sin embargo, para cubrir las necesidades nutricionales del niño es necesario modificar la leche de vaca, especialmente su contenido en proteínas y minerales (Ca y Fe) así como en hidratos de carbono y vitaminas (Hernández Rodríguez, 1999).

Esta adecuación es importante en aquellos niños que reciben esta fórmula como único aporte lácteo a partir de los 4 meses o cuando se utiliza para realizar el destete. A partir de los 6 meses, las posibilidades de alimentación son más amplias y la leche de vaca entera esterilizada ya puede ser utilizada, siempre y cuando la calidad y cantidad de los demás alimentos sea adecuada (Hernández Rodríguez, 1999).

En Diciembre de 2006, la Comunidad Económica Europea estableció una directiva relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y que modifica a la anterior directiva 1999/21/CE. En la Tabla 3 se muestran las modificaciones para la elaboración de una fórmula de continuación.

Tabla 2. Composición básica para preparados para lactantes

Componentes	Unidades	Mínimo	Máximo
Energía	Kcal/100 ml	60	70
Proteínas			
Leche de vaca	g/100 Kcal	1.8	3
Hidrolizados de proteínas	g/100 Kcal	2.25	3
Aislados de proteína de soja	g/100 Kcal	1.8	3
Lípidos			
Grasa total	g/100 Kcal	4.4	6.0
Ácido linoleico	g/100 Kcal	0.3	1.2
Ácido α -linolénico	g/100 Kcal	50	NS
Ratio Ácidos linoleico/ α -linolénico		5:1	15:1
Ácidos Laurico + Mirístico	% materia grasa	NS	20
Ácidos grasos trans	% materia grasa	NS	3
Ácido Erúcico	% materia grasa	NS	1
Carbohidratos			
Carbohidratos totales	g/100 Kcal	9.0	14.0
Vitaminas			
Vitamina A	μg RE/100 Kcal	60	180
Vitamina D ₃	μg/100 Kcal	1	2.5
Vitamina E	mg α-TE/100Kcal	0.5	5
Vitamina K	μg/100 Kcal	4	25
Tiamina	μg/100 Kcal	60	300
Riboflavina	μg/100 Kcal	80	400
Niacina	μg/100 Kcal	300	1500
Vitamina B ₆	μg/100 Kcal	35	175
Vitamina B ₁₂	μg/100 Kcal	0.1	0.5
Ácido Pantoténico	μg/100 Kcal	400	2000
Ácido fólico	μg/100 Kcal	10	50
Vitamina C	μg/100 Kcal	10	30
Biotina	μg/100 Kcal	1.5	7.5
Minerales y Elementos traza			
Hierro (fórmula basada en las proteínas de vaca e hidrolizados de proteínas)	mg/100 Kcal	0.3	1.3
Hierro (fórmula basada en aislados de proteínas de soja)	mg/100 Kcal	0.45	2.0
Calcio	mg/100 Kcal	50	140
Fósforo (Fórmula basada en las proteínas de vaca e hidrolizados de proteínas)	mg/100 Kcal	25	90
Fósforo (fórmula basada en aislados de proteínas de soja)	mg/100 Kcal	30	100
Ratio Calcio/Fósforo	mg/mg	1:1	2:1
Magnesio	mg/100 Kcal	5	15
Sodio	mg/100 Kcal	20	60
Cloro	mg/100 Kcal	50	160
Potasio	mg/100 Kcal	60	160
Manganeso	μg/100 Kcal	1	100
Flúor	μg/100 Kcal	NS	100
Yodo	μg/100 Kcal	10	50
Selenio	μg/100 Kcal	1	9
Cobre	μg/100 Kcal	35	100
Cinc	mg/100 Kcal	0.5	1.5
Otras sustancias			
Colina	mg/100 Kcal	7	50
Mio-inositol	mg/100 Kcal	4	40
L-carnitina	mg/100 Kcal	1.2	NS
Taurina	mg/100 Kcal	NS	12

Tabla 3. Composición básica para preparados de continuación

Componentes	Unidades	Mínimo	Máximo
Energía	Kcal/100 ml	60	70
Proteínas			
Leche de vaca	g/100 Kcal	1.8	3.5
Hidrolizados de proteínas	g/100 Kcal	2.25	3.5
Aislados de proteína de soja	g/100 Kcal	1.8	3
Lípidos			
Grasa total	g/100 Kcal	4.0	6.0
Ácido linoleico	g/100 Kcal	0.3	1.2
Ácido α -linolénico	mg/100 Kcal	50	NS
Ratio Ácidos linoleico/ α -linolénico		5:1	15:1
Ácidos Laurico + Mirístico	% materia grasa	NS	20
Ácidos grasos trans	% materia grasa	NS	3
Ácido Erúcido	% materia grasa	NS	1
Carbohidratos			
Carbohidratos totales	g/100 Kcal	9.0	14.0
Vitaminas			
Vitamina A	μg RE/100 Kcal	60	180
Vitamina D ₃	μg/100 Kcal	1	3.0
Vitamina E	mg α-TE/100Kcal	0.5	5
Vitamina K	μg/100 Kcal	4	25
Tiamina	μg/100 Kcal	60	300
Riboflavina	μg/100 Kcal	80	400
Niacina	μg/100 Kcal	300	1500
Vitamina B ₆	μg/100 Kcal	35	175
Vitamina B ₁₂	μg/100 Kcal	0.1	0.5
Ácido Pantoténico	μg/100 Kcal	400	2000
Ácido fólico	μg/100 Kcal	10	50
Vitamina C	μg/100 Kcal	10	30
Biotina	μg/100 Kcal	1.5	7.5
Minerales y Elementos traza			
Hierro (fórmula basada en las proteínas de vaca e hidrolizados de proteínas)	mg/100 Kcal	0.6	2.0
Hierro (fórmula basada en aislados de proteínas de soja)	mg/100 Kcal	0.9	2.5
Calcio	mg/100 Kcal	50	140
Fósforo (Fórmula basada en las proteínas de vaca e hidrolizados de proteínas)	mg/100 Kcal	25	90
Fósforo (fórmula basada en aislados de proteínas de soja)	mg/100 Kcal	30	100
Ratio Calcio/Fósforo	mg/mg	1:1	2:1
Magnesio	mg/100 Kcal	5	15
Sodio	mg/100 Kcal	20	60
Cloro	mg/100 Kcal	50	160
Potasio	mg/100 Kcal	60	160
Manganeso	μg/100 Kcal	1	100
Flúor	μg/100 Kcal	NS	100
Yodo	μg/100 Kcal	10	50
Selenio	μg/100 Kcal	1	9
Cobre	μg/100 Kcal	35	100
Cinc	mg/100 Kcal	0.5	1.5
Otras sustancias			
Colina	mg/100 Kcal	7	50
Mio-inositol	mg/100 Kcal	4	40
L-carnitina	mg/100 Kcal	1.2	NS
Taurina	mg/100 Kcal	NS	12

El comité de nutrición de la European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology y Nutrition (ESPGHAN) recomienda el preparado de continuación como un alimento

adecuado para lactantes de entre 5 y 12 meses y de entre 1 y 3 años dentro de una dieta diversificada. Las características de un preparado de continuación son una densidad energética similar a los preparados para lactantes, la adición de carbohidratos se mantiene en las mismas proporciones, en cuanto a los niveles mínimos y máximos, se permitirá la adición de miel que junto con la fructosa y sacarosa no excederán el 20% del contenido total de carbohidratos. Contiene mayor cantidad de proteínas que los preparados de inicio, pero no es necesario modificar la relación lactoalbúmina:caseína. En cuanto al contenido de hierro en los preparados de continuación es mayor que en los preparados de inicio, tanto en las basadas en proteínas de vaca e hidrolizados de proteínas (0.6-2 mg /100 Kcal) como en los aislados de proteínas de soja (0.9-2.5 mg/100 Kcal). El aporte de grasas es bastante similar al de los preparados de inicio y debe ser al menos el 35% del aporte calórico total del preparado. Dado que el contenido de grasas es bajo en la mayoría de los alimentos complementarios a estas edades, es aceptable que la leche tenga hasta 6g de grasa/100 Kcal, lo que supone un aporte de 40-55% del aporte calórico del preparado (ESPGHAN, 1991). No existe motivo para sustituir la grasa animal por vegetal, y no hay que suplementar los ácidos grasos esenciales por sistema si la alimentación complementaria del lactante los contiene (Ferrer-Lorente y Dalmau-Serra, 2005).

La leche de vaca no es un alimento idóneo durante el primer año de vida. La ingestión proteica de los niños alimentados con leche de vaca es más alta que la de los alimentados con preparados y esto conlleva a una sobrecarga renal de solutos (ESPAGHAN, 1990), además una ingestión proteica elevada puede provocar una hipercalcemia (Kersletter y col., 1999; NIH, 2001). Por otra parte, el consumo alto de leche de vaca por debajo del año de vida es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la anemia por deficiencia de hierro (Haschke, 1999, 2000). La leche de vaca tiene un bajo contenido en hierro y gran parte de ese hierro está unido a la caseína, lo que interfiere en su absorción. De igual forma, su bajo contenido en vitamina C no favorece tampoco la absorción del poco hierro que contiene (Ferrer-Lorente y Dalmau-Serra, 2005). El uso de preparados de continuación suplementados con hierro ayuda a prevenir el desarrollo de la anemia deficiente en hierro durante la infancia, siendo recomendable desde los 4 a 36 meses, y las de crecimiento a partir del año de vida (ESPGHAN, 1991).

Las leches de crecimiento, *junior* o leches 3 son fórmulas de continuación modificadas parcialmente. No existen unas recomendaciones exclusivas para la formulación de estas leches ni tampoco una legislación específica, por lo que la industria alimentaria se ajusta a las recomendaciones existentes para las fórmulas de continuación y a los estudios sobre nuevos factores nutricionales que se van realizando y de los que se infieren recomendaciones del producto (Ferrer-Lorente y Dalmau-Serra, 2005). La normativa

europea (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1991) para el etiquetado de las fórmulas de inicio y continuación es muy explícita y establece todos los datos que deben aparecer : el valor energético y el contenido en proteínas, lípidos e hidratos de carbono por cada 100 mL de producto lista para el consumo y, de igual forma, la cantidad media de sustancias minerales, vitaminas y otros productos que contengan (carnitina, colina....), así como las instrucciones para la correcta preparación del producto. Estas fórmulas de crecimiento van suplementadas con hierro, vitaminas y oligoelementos. El contenido en proteínas, lípidos e hidratos de carbono de las leches de crecimiento es muy similar al de las fórmulas de continuación. Todas las leches de crecimiento presentan un valor energético aproximado de entre 65-77 Kcal/100 mL. El contenido proteico es ligeramente más alto que el de las fórmulas de continuación, pero entro de las recomendaciones establecidas; el de los hidratos de carbono y lípidos es muy similar, aunque las fórmulas de crecimiento modifican el perfil lipídico utilizando aceites vegetales. La mayoría contiene sacarosa y/o miel (Ferrer-Lorente y Dalmau-Serra, 2005).

Parece que todas estas innovaciones se derivan de los hallazgos realizados en estudios sobre la composición de la leche materna, siempre intentando que la composición de las fórmulas sea lo más aproximada a aquella. Sin embargo, es necesario profundizar en los efectos de todas estas sustancias y sus beneficios a largo plazo para efectuar cualquier recomendación

2. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DEL HIERRO EN LA INFANCIA

El hierro es esencial para la vida de los organismos. La función dominante del hierro en el cuerpo humano es fijar el oxígeno a la hemoglobina, encargada de transportar el oxígeno desde los pulmones a todos los tejidos. El rápido crecimiento hace de los lactantes y los niños de corta edad un grupo de riesgo particular para la anemia deficiente en hierro. En 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que la prevalencia de anemia en los niños por debajo de los 4 años de edad era del 43%, con una prevalencia más elevada (51%) en los países en vías de desarrollo en comparación con los países industrializados (12%) (Fairweather-Tait, 1996). Las últimas estimaciones presentadas por la OMS estableció que la prevalencia de anemia en los grupos anteriores en los países en vías de desarrollo era de un 39% y en los países industrializados de un 20% (WHO, 2002). En poblaciones desarrolladas la alimentación exclusiva con leche materna previene la anemia deficiente en hierro durante la primera mitad de la infancia en lactantes sanos a término (Pisacane y col., 1995). Los niños de corta edad a término sanos alimentados con fórmula infantil no enriquecida con hierro rara vez desarrollan la anemia deficiente en hierro antes de los 4 meses de edad, pero presentan un mayor riesgo de padecerla que aquellos

alimentados con leche materna después de esa edad (Pizarro y col., 1991; Moffatt y col., 1994). Por esta razón, la mayoría de las fórmulas infantiles son enriquecidas con hierro.

En el recién nacido el contenido de hierro es de 250 a 300 mg (75 mg/kg peso corporal). Durante los primeros dos meses de vida, la concentración de hemoglobina desciende debido al mayor aporte de oxígeno en el recién nacido comparado con la del feto. Esto conduce a una considerable redistribución del hierro desde los eritrocitos catabolizados a las reservas de hierro. Este hierro, por lo tanto, cubriría las necesidades del recién nacido durante los primeros 4-6 meses de vida (FAO/WHO, 1988/revisión 2004). Este hecho, es debido a que la hemoglobina fetal tiene una mayor afinidad al oxígeno que la hemoglobina adulta, facilitando la transferencia del oxígeno al feto a través de la superficie de la placenta. Al nacer, el recién nacido empieza a producir hemoglobina adulta, por lo que la concentración de hemoglobina necesaria será más baja. Por tanto habrá un exceso de hierro en el cuerpo que servirá de colchón durante los primeros 4-6 meses de vida (Hallberg, 2002). Debido al marcado suministro de hierro al feto durante el último trimestre del embarazo, su estatus es mucho menos favorable en los prematuros y en los recién nacidos con bajo peso que en los recién nacidos a término. Un suministro extra de hierro es por lo tanto necesario en estos niños incluso durante los primeros seis meses de edad (FAO/WHO, 1988/revisión 2004).

Una parte sustancial de la renovación del hierro es desviada a los tejidos en crecimiento. A los 6 meses los lactantes requieren 0.5 mg Fe/día para la expansión del volumen sanguíneo y 0.1 mg Fe/día para el crecimiento de los músculos y otros tejidos. Ya que los requerimientos para el hierro, excluyendo el crecimiento, igualarían las pérdidas de hierro (0.15 mg Fe/día), el crecimiento del lactante aumenta los requerimientos para el hierro unas cinco veces, siendo aproximadamente de 0.75 mg Fe/día. Oski (1993) estimó que el requerimiento medio del hierro absorbido durante el primer año de vida era de 280 mg (0.8 mg Fe/día). Tal ingesta es imposible de alcanzar con alimentos complementarios no modificados, sugiriendo que la adición de hierro es necesaria, bien como hierro adicionado a los alimentos de primera necesidad o como suplementos de hierro, con el objetivo de cubrir las necesidades estimadas (WHO, 1998).

A pesar del documentado efecto preventivo sobre la deficiencia en hierro de adicionar hierro en las fórmulas infantiles, la anemia deficiente en hierro en la infancia es aún un problema de salud pública, no solamente en los países en vías de desarrollo (Haschkle y Male, 1996; ESPGHAN, 2002), sino también en ciertas poblaciones de los países industrializados, entre quienes las fórmulas no enriquecidas y la leche de vaca no modificada aún son usadas ampliamente (Daly y col., 1996; Freeman y col., 1998). La alimentación con leche materna, la adición de hierro a los alimentos infantiles incluyendo las

fórmulas, y no consumir la leche de vaca no modificada en la dieta de los niños de corta edad son claves en la lucha contra la anemia deficiente en hierro (AAP, 1999; ESPGHAN, 2002).

La concentración de hierro en la leche humana es de 0.3 mg/L, que es aproximadamente la misma que la leche de vaca, pero con la salvedad de que la biodisponibilidad es al menos cinco veces superior a la leche de vaca. El contenido de hierro en las fórmulas infantiles comercialmente disponibles varía ampliamente, alrededor de 1 mg/l en fórmulas no enriquecidas a aproximadamente 15 mg/l en algunas fórmulas enriquecidas con hierro. Distintas autoridades han recomendado varios niveles de hierro para su uso en las fórmulas infantiles. Sin embargo, no hay un consenso con respecto al nivel de enriquecimiento. En los Estados Unidos, la mayoría de las fórmulas presentes en el mercado están enriquecidas al nivel superior según las recomendaciones actuales, de 10 a 12 mg de hierro elemental/l, mientras que en Europa las fórmulas infantiles están enriquecidas con un nivel más bajo, 4 a 7 mg/l (Ruíz y col., 1996; AAP, 1999). Aunque la concentración de hierro en la leche humana es baja (0.2 a 0.4 mg/L), es parcialmente compensada por su elevada biodisponibilidad, aproximadamente un 50% (Saarinen y col., 1977). La absorción del hierro de fórmulas infantiles y leche de vaca varían de un 2-19%, con un valor medio del 10% (ESPGHAN, 2002). La leche de vaca contiene casi 4 veces más calcio y 6 veces más fósforo que la leche humana madura. En un estudio realizado por Hallberg y col. (1992), observaron que la amplia variabilidad en la biodisponibilidad de la leche humana y de vaca en individuos adultos sanos (más del 70%) podría ser explicada por el contenido de calcio.

En la leche humana madura, la relación entre la proteína del suero y la caseína es alrededor de 60:40, mientras que en la leche de vaca es del 20:80. Los efectos de la composición proteica de la leche en la absorción del hierro fueron estudiados por Hurrell y col. (1989) y encontraron que tanto la caseína bovina como la proteína del suero obstaculizaban la absorción del hierro. A diferencia de la leche de vaca, la leche humana contiene elevadas concentraciones de proteínas del suero fijadoras del hierro y lactoferrina, esta última facilita la absorción del hierro de la leche humana. La lactoferrina presenta una elevada afinidad por hierro, es estable contra la digestión proteolítica intestinal, y se une a los receptores específicos en la mucosa intestinal humana (Hernell y Lönnnerdal, 2002). Asumiendo una ingesta diaria de 800 ml de leche materna y una concentración de hierro de 0.3 mg/l, del cual el 50% es absorbido, por tanto un lactante de 4 meses de edad absorbería 0.12 mg/Kg/día. Esta cantidad debe ser suficiente para cubrir las pérdidas de hierro basal estimadas en 20 mg/kg/día (Oski, 1993), pero sin embargo no se tiene en cuenta la ganancia neta de hierro. Para alcanzar la misma absorción de hierro de una fórmula (asumiendo que el 10% es absorbido), el contenido de hierro de la fórmula debería ser cinco

veces más elevada que en la leche humana, o 1.5 mg/l. En un estudio llevado a cabo en recién nacidos a término, no observaron diferencias significativas en la concentración de hemoglobina y en el estado nutricional a los 6 meses, en lactantes de un mes de vida, alimentados con una fórmula cuya concentración era de 2 mg/l comparados con aquellos alimentados con la misma fórmula con una concentración de 4 mg/l, o alimentados exclusivamente con leche materna (Hernell y Lönnerdal, 2002). Esto sugiere que durante la primera mitad de la infancia, un nivel de enriquecimiento de 2 mg/l es suficiente para lactantes sanos a término.

Además, la adición de hierro a fórmulas infantiles destinadas a lactantes sanos a término no sería necesaria antes de los 4 meses. Esto está apoyado por un estudio, en el que se comparó lactantes alimentados con leche materna con otros alimentados con fórmula infantil no enriquecida (< 1 mg Fe/l) o una fórmula enriquecida (5 mg Fe/l) desde el nacimiento hasta los 3 meses de vida. En otro estudio llevado a cabo por Tuthill y col. (2002) no observaron diferencias en la concentración de la hemoglobina o en el estado nutricional ni a los 3 meses ni a los 12 meses.

El déficit de hierro es la deficiencia nutricional más prevalente en los niños (Booth y Aukett, 1997; Vázquez-López y col., 2001) y la deficiencia subclínica de hierro es especialmente común en la primera infancia (Dallman y Yip, 1989; Haschke y Male, 1996). La anemia por deficiencia en hierro puede tener efectos adversos sobre el desarrollo cognitivo y motor (Lozoff y col., 2003). De hecho, dicha deficiencia de hierro se ha relacionado con retraso mental y psicomotor, afectando a la capacidad de aprendizaje y al comportamiento (Lozoff y col., 2003; Sachdev y col., 2005). Aunque existe controversia sobre si la anemia por deficiencia de hierro tiene un efecto negativo sobre el desarrollo, es obvio que se pueden tomar medidas para prevenir esta deficiencia durante la infancia (Hernell y Lönnerdal, 2004).

2.1. Nutrición y metabolismo del hierro

2.1.1. Absorción del hierro

La absorción nutricional tanto del *hierro hemo* como *no hemo* tiene lugar principalmente en el intestino delgado, concretamente en el duodeno y yeyuno proximal (Conrad y col., 1987; Wood y Han, 1998). No obstante recientemente se ha descubierto que en ratas existe una absorción del *hierro no hemo* a nivel del colon proximal. Los mecanismos por los cuales se produce esta absorción en colon no se conocen (Johnston y col., 2006), sin embargo recientemente ha sido cuestionado el papel de la proteína encargada de transportar el hierro hemo (HCP), ya que la función principal de esta proteína parece ser transportar folatos (Qiu y col., 2006). Los enterocitos localizados en las vellosidades del intestino delgado son

células absorbentes, altamente especializadas y polarizadas, que controlan el paso del hierro dietético al lumen del intestino y la transferencia del hierro hacia la circulación sanguínea (Wood y Han., 1998).

La disponibilidad del hierro ingerido para la absorción y la cantidad absorbida dependen de la naturaleza química y la cantidad de hierro en la dieta, la presencia de otros factores en el alimento ingerido, los efectos de las secreciones gastrointestinales y la capacidad absorbente de la mucosa intestinal (Morgan y Oates, 2002). En el alimento el hierro está presente en dos formas: *hierro hemo* y *hierro no hemo* (Martínez y col., 2000). El *hierro no hemo* (o inorgánico) lo encontramos en los alimentos en la forma reducida (Fe^{+2}) o en la forma oxidada (Fe^{+3}). Debido a que el hierro férrico es insoluble a un $\text{pH} > 3$, éste debe ser reducido o quelado en el estómago para estar disponible durante la absorción en el duodeno. Mientras, la mayor parte del hierro ferroso permanece soluble a un $\text{pH} 7$, por lo que la absorción del hierro ferroso es más eficiente que la del hierro férrico (Conrad y col., 1999).

Otros constituyentes dietéticos (fitatos, carbonatos, fosfatos, oxalatos, y taninos) precipitan el hierro férrico formando macromoléculas que no son disponibles para la absorción. No obstante, es posible que una proporción de hierro férrico dietético sea reducido por constituyentes dietéticos y secreciones intestinales a hierro ferroso, el cual sí es soluble a pH neutro. Para que el hierro ferroso permanezca en este estado reducido requiere la presencia continua de sustancias reductoras para mantenerse quelado, de manera que no sea posible la exposición del hierro al oxígeno. Los principales favorecedores de la absorción del *hierro no hemo* son la carne y los ácidos orgánicos, principalmente el ácido ascórbico. Éste actúa reduciendo el hierro férrico a un estado ferroso más soluble, pero además podría quelar el hierro férrico en el medio ácido del estómago. Este complejo no permanecería estable, pero sí soluble en el pH alcalino del tracto gastrointestinal. Dentro de los inhibidores de la absorción del hierro no hemo se incluyen los polifenoles presentes en los vegetales, legumbres y condimentos; los fitatos, que constituyen entre el 1-2 % de muchos cereales, nueces y legumbres; la fibra dietética, el calcio y el fósforo, y algunas proteínas como las lácteas (Crichton, 2001).

En la Figura 1, se representa los mecanismos por los cuales tiene lugar la absorción y transporte del hierro tanto *hemo* como *no hemo*. El primer paso en la absorción del hierro es la transferencia del hierro a través de la membrana apical de los enterocitos que en el caso del hierro ferroso está mediada por un “*transportador de cationes divalentes*” DCT1 (Divalent cation transporter 1), o “*transportador de metales divalentes*” DMT1 (Divalent metal transporter 1) (Fleming y col., 1997; Gunshin y col., 1997). El DMT1 es capaz de transportar no solamente el Fe^{+2} , sino también un amplio rango de cationes divalentes: Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} ,

Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , y Pb^{+2} . Como la mayoría del *hierro no hemo* está en la forma de Fe^{+3} , ésta debe ser primero reducida a su forma ferrosa (Fe^{+2}) para poder ser absorbida. La enzima responsable parece ser una hemoproteína asociada con los enterocitos de la membrana apical, denominada Dcytb (Duodenal cytochrome b), la cual tiene actividad ferrireductasa parecida al citocromo b (McKie y col., 2001). La actividad reductasa está fuertemente estimulada en estados de hipoxia y deficiencia en hierro, incrementando la absorción del hierro dietético. Además, esta actividad enzimática es más elevada en el duodeno y más baja en el íleon, situación que coincide con el perfil de la absorción del hierro a lo largo del intestino (McKie y col., 2002).

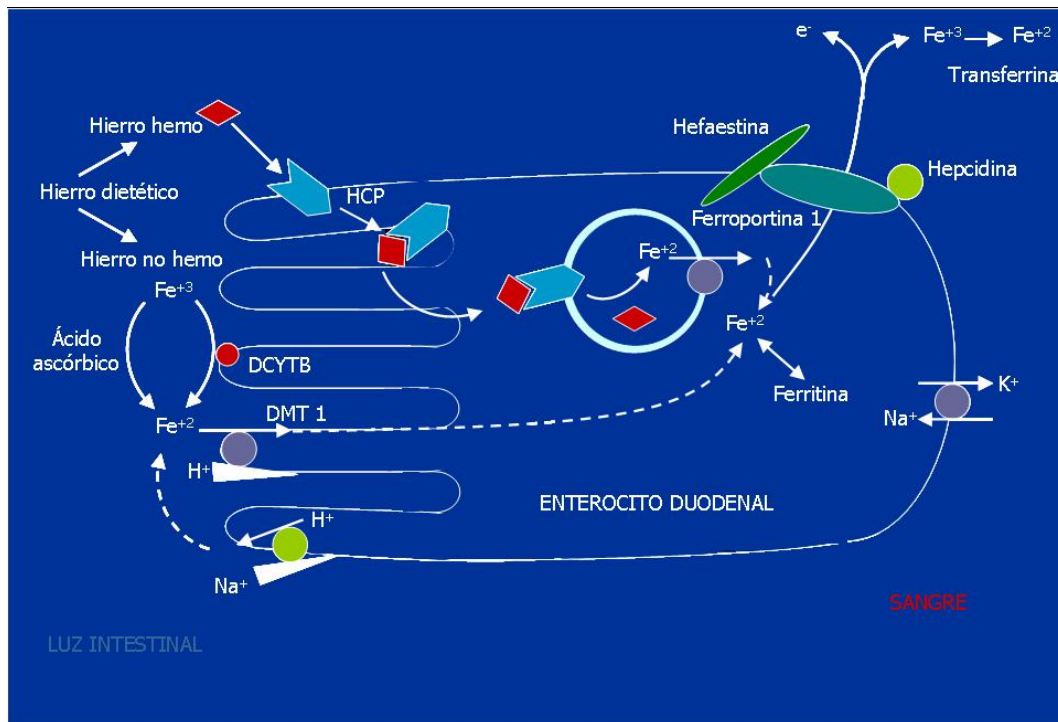


Figura 1. Transporte del hierro a través del epitelio intestinal. La ferrireductasa (Dcytb) reduce el Fe^{+3} a Fe^{+2} . La DMT 1 bombea el hierro hacia la mucosa de la célula donde es almacenado en la forma de ferritina o transportado por la mobilferrina. En la zona basolateral el hierro es re-oxidado y liberado a la circulación sanguínea por el complejo ferroportina / hefaestina. En la sangre el hierro es unido inmediatamente a la transferrina. DMT 1, "Transportador de metales divalentes" Dcytb, "Duodenal cytochromo b"

Una vez en el interior del enterocito, el hierro tiene dos posibles destinos. La porción que no es necesaria para su uso inmediato es almacenada como ferritina dentro del enterocito; la cual es eliminada del organismo vía fecal al final de la vida media de estas células. La otra porción del hierro es transferido a través de la membrana basolateral a la transferrina plasmática (Andrews, 2005). El transporte del hierro desde los enterocitos hacia el torrente sanguíneo, es llevada a cabo por la acción coordinada de la *ferroportina 1* (Abboud y Haile, 2000; Donovan y col., 2000; McKie y col., 2000) y una ferroxidasa denominada *hefaestina*, presente en la membrana celular (Vulpe y col., 1999). La *ferroportina1* se expresa principalmente en la membrana basolateral de los enterocitos (McKie y col., 2000), placenta,

hígado, bazo, macrófagos y riñones (Donovan y col., 2000). Además de su papel en la transferencia de hierro desde el intestino a la circulación, también interviene en el transporte del hierro a otros órganos, principalmente la placenta, donde el hierro se transfiere entre la circulación maternal y fetal (McKie y col., 2000). La *hephaestina* es un homólogo de la *ceruloplasmina*, la cual es una proteína que contiene cobre con actividad ferroxidasa que es requerida para la liberación del hierro a la circulación sanguínea y para la fijación a la transferrina (Harris y col., 1998).

La hepcidina es una hormona reguladora secretada por el hígado que inhibe tanto la absorción como la liberación del hierro de los macrófagos y otros tipos de células (Ganz, 2005). La hepcidina parece unirse a la ferroportina 1 en la membrana basolateral del enterocito, causando su internalización y degradación (Nemeth y col., 2004). En estados de deficiencia en hierro, la liberación de la hepcidina por el hígado disminuye y por tanto la absorción del hierro aumenta al máximo (Nicolas y col., 2002; Nemeth y col., 2003).

En cuanto a la absorción del *hierro hemo*, se sabe que es soluble a pH del duodeno y su entrada a los enterocitos no está influida por los constituyentes dietéticos que afectan al hierro inorgánico, a excepción del calcio, el cual es el único factor dietético encontrado que inhibe la absorción tanto del *hierro hemo* como la del *hierro no hemo* (Deehr y col., 1990; Cook y col., 1991; Hallberg y col., 1991a; Hallberg y col., 1992). Además, la absorción del *hierro hemo* es más eficaz que la del *hierro no hemo* (5-35% vs 2-10%) (Hurrell, 1997a).

Según los primeros estudios sobre la absorción del *hierro hemo*, el *hierro hemo* se unía a la membrana en borde de cepillo de los enterocitos del duodeno y se internaba de manera intacta al interior a través de la membrana, para posteriormente unirse a unas vesículas dentro del citoplasma (Parmley y col., 1981a; Wyllie y Kaufman., 1982). El *hierro hemo* es entonces degradado por la *hemo oxigenasa* liberando el hierro ferroso y el pigmento biliar biliverdina, posteriormente éste hierro entra a formar parte en los mecanismos de transporte relacionados con el *hierro no hemo*, saliendo del enterocito a través del transportador de la membrana basolateral, *ferroportina 1* (McKie y col., 2000; Donovan y col., 2000). Aunque se ha demostrado que el *hierro hemo* puede difundirse a través de las membranas lipídicas debido a su naturaleza hidrofóbica (Light y Olson, 1990), estudios en hepatocitos (Noyer y col., 1998) y en la línea celular Caco-2 (Worthington y col., 2001) han demostrado que la entrada del *hierro hemo* tiene lugar por un proceso mediado por un transportador. Este transportador ha sido descrito por Shayeghi y col. (2005) y es expresado en la región apical de las células epiteliales del duodeno, denominándose “proteína transportadora del hierro hemo 1” (HCP1).

2.1.2. Regulación de la absorción del hierro

En los mamíferos al no poseer ninguna vía fisiológica para la excreción del hierro, la homeostasis del hierro está regulada a nivel de su absorción. Existen tres vías reguladoras que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del hierro (Andrews, 1999a; Finch, 1994):

✓ Primero, la absorción del hierro puede estar modulada por la cantidad de hierro recientemente consumida en la dieta, un mecanismo referido como el “*regulador dietético*” (Andrews y col., 1999a,b). Durante varios días después de la ingesta de hierro presente en la dieta, los enterocitos se hacen resistentes a adquirir más hierro. Este fenómeno es llamado “bloqueo de la mucosa” (Andrews y col., 1999a,b), y probablemente resulte de la acumulación de hierro a nivel intracelular, por lo que el enterocito cree que los requerimientos para el hierro han sido alcanzados.

✓ Un segundo mecanismo de regulación denominado “*regulador de reservas*”, controla la entrada de hierro en función de las reservas de hierro presentes en el organismo. El “*regulador de reservas*” es capaz de cambiar la cantidad de hierro absorbido a un límite relativamente más modesto; es decir en estados de deficiencia de hierro la absorción de hierro se ve aumentada dos o tres veces, y cuando las reservas de hierro son replecionadas, la absorción de hierro vuelve a su nivel basal. Esta función es crítica para la homeostasis del hierro. El *regulador de reservas* probablemente actúe sobre las células progenitoras en la cripta de Lieberkühn, controlando la cantidad de hierro captado, por lo tanto programándolas para una adecuada actividad absorbente cuando maduren (Conrad y col., 1963). Ha sido postulado que los componentes solubles pueden servir como reguladores de las reservas: ferritina sérica, transferrina, o el receptor soluble de la transferrina (Finch, 1994). Actualmente, un nuevo candidato ha sido incluido como regulador de las reservas: la *Hepcidina* (Ganz, 2003).

✓ El tercer mecanismo de regulación es conocido como el “*regulador eritropoyético*”, y tiene mayor capacidad para incrementar la absorción del hierro que el “*regulador de reservas*”. El “*regulador eritropoyético*” no responde a los niveles de hierro celular en general (Finch, 1994), sino que modula la absorción del hierro en respuesta a los requerimientos para la eritropoyesis, es decir, ajusta la absorción del hierro intestinal en respuesta a las demandas de la eritropoyesis, independientemente de las reservas de hierro corporal (Finch, 1994; Andrews, 1999a). Es posible que el *regulador eritropoyético* requiera de una señal soluble que sea transportada por el plasma desde la médula ósea al intestino, pero esta señal aún no ha sido identificada.

2.2. Requerimientos fisiológicos del hierro durante el crecimiento

En el recién nacido el contenido de hierro es de 250 a 300 mg (75 mg/kg peso corporal). Durante los primeros dos meses de vida, la concentración de hemoglobina desciende debido al mayor aporte de oxígeno en el recién nacido comparado con la del feto. Esto conduce a una considerable redistribución del hierro desde los eritrocitos catabolizados a las reservas de hierro. Este hierro, por lo tanto, cubriría las necesidades del recién nacido durante los primeros 4-6 meses de vida (FAO/WHO, 1998/revisión 2004). Este hecho, es debido a que la hemoglobina fetal tiene una mayor afinidad al oxígeno que la hemoglobina adulta, facilitando la transferencia del oxígeno al feto a través de la superficie de la placenta. Al nacer, el recién nacido empieza a producir hemoglobina adulta, por lo que la concentración de hemoglobina necesaria será más baja. Por tanto habrá un exceso de hierro en el cuerpo que servirá de colchón durante los primeros 4-6 meses de vida (Hallberg, 2002). Debido al marcado suministro de hierro al feto durante el último trimestre del embarazo, la situación del hierro es mucho menos favorable en los prematuros y en los recién nacidos con bajo peso que en los recién nacidos a término. Un suministro extra de hierro es por lo tanto necesario en estos niños incluso durante los primeros seis meses de edad (FAO/WHO, 2002).

En el primer año de vida, el recién nacido dobla sus reservas de hierro y triplica su peso corporal. Entre la edad de 1 a 6 años, el contenido de hierro corporal se duplica de nuevo. Los requerimientos para el hierro en los recién nacidos y niños son por tanto muy elevados en relación a sus requerimientos energéticos (FAO/WHO, 2002).

En la adolescencia, los requerimientos de hierro vuelven a elevarse, especialmente durante el periodo de rápido crecimiento "estirón puberal", éstos son calculados a partir de los requerimientos necesarios para la expansión del volumen sanguíneo total (de media 0,18 mg/día en varones y 0,14 mg/día en chicas) y del incremento en el comportamiento de hierro corporal esencial debido al incremento de la masa magra (0,55 mg/día en varones, y 0,33 mg/día en chicas, de requerimientos adicionales medios). En el aumento de los requerimientos de hierro por el incremento de la masa eritrocitaria se incluyen el incremento de hemoglobina media desde los años escolares hasta el estirón puberal de la adolescencia (Beard, 2000). A las necesidades por crecimiento corporal hay que añadir en las chicas la cantidad de hierro perdido en la menstruación, que no difiere de las pérdidas de mujeres en edad reproductiva (Hallberg, 1996). Por ello, los requerimientos diarios de hierro se situarían en 2,1 mg/día en chicas con unas pérdidas de menstruales en el percentil 75 (Beard, 2000).

Las ingestas dietéticas de referencia (IDR), en inglés (DRI, Dietary Reference Intake) están constituidas por cuatro valores de referencia (IOM, 2000):

- ❖ “Requerimiento medio diario” o EAR (Estimated Average Requirements)
- ❖ “Recomendaciones dietéticas” o RDA (Recommended Dietary Allowances)
- ❖ “Ingestas adecuadas” o AI (Adequate Intake)
- ❖ “Nivel de ingesta máxima tolerable” o UL (Tolerable Upper Intake Level)

En la Tabla 4 se representan la ingesta dietética de referencia (IDR) del hierro en las distintas etapas de la vida

Tabla 4. Ingesta dietéticas de referencia (DRI) de hierro en las distintas etapas de la vida.

Grupos de edad	RDA/AI (mg/día)	EAR (mg/día)	UL (mg/día)
<i>Recién nacidos</i>			
0 a 6 meses	0.27	-	40
7 a 12 meses	11	6.9	40
<i>Niños</i>			
1 a 3 años	7	3	40
4 a 8 años	10	4.1	40
<i>Hombres</i>			
9 a 13 años	8	5.9	40
14 a 18 años	11	7.7	45
19 a > 70 años	8	6	45
<i>Mujeres</i>			
9 a 13 años	8	5.7	40
14 a 18 años	15	7.9	45
19 a 50 años	18	8.1	45
51 a > 70 años	8	5	45
<i>Embarazadas</i>			
≤ 18 años	27	23	45
19 a 50 años	27	22	45
<i>Mujeres lactantes</i>			
≤ 18 años	10	7	45
19 a 50 años	9	6.5	45

(IOM, 2000).

3. ANEMIA, DEFICIENCIA EN HIERRO Y ANEMIA DEFICIENTE EN HIERRO

3.1. Anemia, un problema de salud pública

La *anemia* se define como el estado patológico en el que la concentración de hemoglobina se encuentra por debajo de los niveles normales establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la Tabla 5 se representan los valores límites de hemoglobina establecidos para definir la anemia. Además del sexo, edad, y embarazo existen otros factores como la altitud, raza y hábitos, que influyen en los valores límites para la concentración de la hemoglobina (WHO/UNICEF/UNU, 2001).

La *anemia* es un problema de salud pública generalizado con principales consecuencias para la salud humana y para el desarrollo social y económico. A pesar de que los cálculos de la prevalencia de la anemia varían mucho según las fuentes consultadas, y a menudo no hay datos exactos, podemos suponer que en regiones de pocos recursos una proporción

considerable de niños de corta edad y de mujeres en edad fértil padecen anemia (WHO, 2004). La OMS calcula que en el mundo hay aproximadamente un total de 2 billones de personas anémicas, y que cerca del 50% de los casos pueden atribuirse a la deficiencia en hierro (WHO/UNICEF/UNU, 2001).

Tabla 5. Límites de hemoglobina utilizados para definir la anemia, basados en las recomendaciones de WHO/UNICEF/UNU (2001).

Grupo de edad o género	Hemoglobina (g/L)	Hematocrito (%)
Niños de 6 meses a 5 años	110	33
Niños de 5-11 años	115	34
Niños de 12-13 años	120	36
Mujeres no embarazadas	120	36
Mujeres embarazadas	110	33
Hombres	130	39

3.2. Deficiencia en hierro y anemia deficiente en hierro

La deficiencia de hierro ocurre en tres estados secuencialmente desarrollados:

a) El primer estado es la *depleción de las reservas de hierro*. Esta circunstancia tiene lugar cuando el cuerpo no tiene reservas de hierro pero la concentración de la hemoglobina permanece por encima de los niveles límites establecidos por la OMS. La depleción de las reservas de hierro se define como una disminución en la concentración de la ferritina sérica (<12 µg/l), la cual proporciona una estimación del tamaño de las reservas de hierro en hígado, médula ósea, y bazo (Cook y Finch., 1979; Lynch y Green., 2001). Cada µg/l de ferritina sérica equivale a 8 mg de hierro almacenado en adultos (Bothwell y col., 1979) y a 0.14 mg en niños (Finch y Huebers., 1982). No hay evidencias concluyentes de que una disminución de las reservas de hierro por debajo de dicho límite tenga consecuencias negativas para la salud, pero en caso de un descenso acusado en el balance del hierro, puede conducir a un rápido descenso en el desarrollo de los componentes funcionales (Hercberg y col., 2001).

b) El segundo estado es conocido como *eritropoyesis deficiente en hierro*. Durante este periodo la cantidad de hierro suministrada a la médula ósea y a otros órganos es inadecuada como consecuencia de un insuficiente transporte de este mineral (Lynch y Green., 2001). La concentración de hemoglobina no desciende por debajo de los niveles considerados indicativos de anemia, sin embargo se puede diagnosticar mediante la medición de la saturación de la transferrina sérica, la principal proteína fijadora de hierro responsable del transporte del hierro en el plasma (Brody, 1999), la cual desciende desde un 30-35% hasta menos de un 16%. Además, una concentración en la protoporfirina libre eritrocitaria > 70 µg/dl indica que la formación del *grupo hemo* desde la protoporfirina IX está alterada debido al insuficiente suministro de hierro. Finalmente, la ausencia de hierro

conduce a un incremento en los receptores de la transferrina en la superficie de todos los órganos teniendo por resultado una concentración por encima de 8.5 mg/l (IOM, 2000).

c) El tercer y más severo estado de la deficiencia en hierro es la *anemia deficiente en hierro*, que es diagnosticada según las concentraciones de hemoglobina antes citadas. La anemia deficiente en hierro solamente ocurre en asociación con valores anormales para los indicadores de la deficiencia en hierro, ya que los niveles de hemoglobina bajos no son un indicador específico para la anemia deficiente en hierro. Los niveles de hemoglobina pueden descender por otra serie de razones, por ejemplo las deficiencias nutricionales como la vitamina A, ácido fólico, riboflavina, o deficiencia de vitamina B₁₂ (Allen y Casterline-Sabel, 2001), infecciones como la malaria (Fleming, 1981), y desordenes inflamatorios crónicos (Yip y Dallman, 1988).

4. ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN PARA PREVENIR LA DEFICIENCIA DE HIERRO

Existen tres estrategias de intervención para prevenir la deficiencia en hierro: la administración de suplementos, la diversificación de la dieta y la fortificación o enriquecimiento de alimentos.

4.1. Suplementación

La suplementación con hierro es considerada como una importante estrategia en la prevención y tratamiento de la anemia deficiente en hierro, y puede producir importantes progresos en el desarrollo funcional de los individuos y poblaciones deficientes en hierro (Allen, 2002a). Los suplementos normalmente son proporcionados a un grupo de la población bien definido, no a una población entera, y por un periodo de tiempo limitado. Generalmente, embarazadas, mujeres lactantes y niños, representan los grupos de mayor riesgo cuyas necesidades de hierro son más elevadas. Incluso, aunque tradicionalmente la suplementación es considerada como una propuesta a corto plazo, en realidad puede ser una propuesta a largo plazo en muchas situaciones. En los países industrializados, entre un 10 y 30 % de la población toman suplementos dietéticos regularmente, con el resultado de que las ingesta dietéticas de nutrientes tales como el hierro y el ácido fólico sean favorables en este segmento de la población sin riesgos aparentes o efectos adversos (Dwyer y col., 2001; Kiely y col., 2001).

La anemia tiene su origen en factores tanto nutricionales como no nutricionales. En concreto, a parte del hierro, las deficiencias de micronutrientes tales como las vitaminas A, C, B₁₂ y ácido fólico pueden contribuir al desarrollo de la anemia (Allen y Casterline-Sabel., 2001). Estos nutrientes pueden afectar a la síntesis de la hemoglobina directa o indirectamente, influyendo en la absorción y/o movilización del hierro (Ramakrishnan y col., 2004). En muchos países en vías de desarrollo, las dietas que son pobres en hierro lo son

también en otros nutrientes, debido a las reducidas ingestas de alimentos de origen animal y a las elevadas ingestas de alimentos ricos en inhibidores de la absorción del hierro como son los fitatos. En general, las ingestas de hierro, zinc, ácido fólico, vitamina B₆, B₁₂, vitamina A, riboflavina y calcio están por debajo de los niveles recomendados (Allen, 1995; Huffman y col., 1998). Este hecho ha aumentado el interés de proporcionar nutrientes, además del hierro, para reducir la prevalencia de la anemia (Allen, 1993; Ramakrishnan y Huffman, 2001).

Algunos autores han cuestionado la eficacia de los multinutrientes combinados dentro de un suplemento debido a las posibles interacciones entre los nutrientes o interferencias en los mecanismos de absorción (Argiratos y Samman, 1994; Sadstrom, 2001). Sin embargo, Untoro y col. (2005) y Smuts y col. (2005) concluyeron que la suplementación diaria con una adecuada concentración de múltiples micronutrientes es la mejor de las estrategias evaluadas para mejorar la anemia y el estado nutricional de micronutrientes de los niños en los países en vías de desarrollo. En cambio no se han observado diferencias significativas en el crecimiento y la mortalidad. Otro de las variables a tener en cuenta es la frecuencia y periodicidad de administración de dichos suplementos. En un estudio realizado en niños vietnamitas, se concluyó que la suplementación semanal con múltiples micronutrientes fue igualmente eficaz que la suplementación diaria para mejorar la concentración de hemoglobina, los niveles de zinc en suero y las concentraciones de retinol (Thu y col., 1999).

4.2. Diversificación de la dieta

El hierro en los alimentos se encuentra en dos formas químicas: *hierro hemo* (que forma parte de la hemoglobina y la mioglobina de la carne), y *hierro no hemo* (presente en los cereales, verduras, también en la carne y en otros alimentos). Estas dos formas de hierro se absorben por diferentes rutas y con una eficacia distinta. El hierro *hemo* es utilizado de manera más eficiente por nuestro organismo (Martínez y col., 1998) mientras que el hierro *no hemo* se absorbe en menor proporción ya que su solubilidad es menor, y además se ve afectado por la presencia de otros constituyentes de la dieta (Van Moorsell, 1997). Así, encontramos promotores de la absorción del hierro en los alimentos, como el ácido cítrico y el ascórbico, la fructosa, la carne y el pescado, y la vitamina A y, por otra parte, inhibidores de la absorción de este mineral, como son el ácido fítico, los polifenoles y los oxalatos, que se unen al mineral formando complejos insolubles (Allen y Ahluvalia, 1997). El calcio y otros cationes como el cobre, el zinc, manganeso o cobalto, también disminuyen la absorción del hierro, puesto que comparten las mismas rutas de entrada en las células de la mucosa intestinal.

De lo anterior, podemos deducir que el *hierro hemo* está disponible más fácilmente para el organismo que el hierro *no hemo*. No obstante, existen factores relacionados con el consumidor que influyen en la absorción de ambos tipos de hierro. Así, cuando los niveles corporales de hierro se encuentran disminuidos aumenta la absorción de hierro de la dieta. La concentración de los ácidos del jugo gástrico también influye en la absorción de hierro inorgánico, por lo que individuos con aclorhidria o incluso los niños, absorben de manera menos eficiente este mineral (BNF, 1996).

Otra de las estrategias para prevenir la deficiencia en hierro es incrementar la ingesta de alimentos con hierro de elevada biodisponibilidad. La biodisponibilidad se refiere a la cantidad de hierro que se absorbe de los alimentos para ser utilizado en las funciones y los procesos metabólicos normales, y como hemos mencionado, se ve afectada tanto por factores de la dieta como por condiciones fisiológicas de las personas. De esta forma, podemos mejorar la cantidad de *hierro no hemo* absorbible mediante una apropiada combinación de alimentos. Las dietas pueden clasificarse en tres categorías: de “baja”, “media” y “alta” biodisponibilidad en hierro, con una absorción media del mineral de 5, 10 y 15% respectivamente (FAO/WHO, 1988). Las dietas con “baja” biodisponibilidad se componen de cereales y tubérculos, ricos en inhibidores de la absorción del hierro como el ácido fítico, y pequeñas cantidades de carne, pescado o alimentos ricos en ácido ascórbico. Es la base de la alimentación en los países en vías de desarrollo y en sectores de población económicamente desfavorecidos. Las dietas de biodisponibilidad “media” están constituidas principalmente por cereales y tubérculos pero se incluyen en ella alimentos ricos en ácido ascórbico y carne en proporciones intermedias. Por último, las dietas de “alta” biodisponibilidad contienen importantes cantidades de carne y pescado, cítricos y verduras.

En el ámbito doméstico es posible preparar y/o procesar los alimentos para reducir el nivel de inhibidores o aumentar el contenido de promotores de la absorción mejorando la biodisponibilidad de este mineral. Estas prácticas tienen especial importancia en los países en vías de desarrollo, donde se consumen dietas de baja biodisponibilidad ricas en cereales, leguminosas y tubérculos (Tontisirin y col., 2002). La germinación, el malteado y la fermentación en los alimentos anteriormente mencionados pueden aumentar la absorción de hierro hasta 12 veces, probablemente debido a la reducción del contenido en ácido fítico (Tontisirin y col., 2002). También se ha demostrado que el mantenimiento de las legumbres y los cereales en remojo antes de su cocinado elimina antinutrientes como las saponinas y los polifenoles, que son potentes inhibidores de la absorción del *hierro no hemo* (Brune y col., 1989). Además se ha visto que en el caso de los tubérculos un calentamiento suave, aumenta la absorción de hierro no hemo (Marfo y col., 1990).

4.3. Enriquecimiento

El enriquecimiento de los alimentos con diversos micronutrientes es un método tecnológico, programado y económicamente eficaz para incrementar la ingesta de micronutrientes en la población (Nestlé, 1993; Lotfi y col, 1996; Darnton-Hill, 1998). Esta estrategia ha jugado un importante papel en la mejora de la salud nutricional y bienestar de las poblaciones en los países industrializados. Iniciado en el siglo XX, el enriquecimiento fue utilizado en situaciones específicas para prevenir ciertas enfermedades: el bocio con sal yodada; raquitismo con leche enriquecida con vitamina D; beriberi, pelagra y anemia con cereales enriquecidos con vitaminas del grupo B; y la aparición de defectos del tubo neural en embarazadas, con cereales enriquecidos con ácido fólico (Darnton-Hill y Nalubola, 2002).

Según el *Codex Alimentarius* el enriquecimiento se define como la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento, esté presente o no de forma natural en dicho alimento, con el propósito de prevenir o corregir una demostrada deficiencia de uno o más nutrientes en la población o grupos de la población específica (FAO, 1996).

El enriquecimiento, tiene la ventaja de requerir menos cambios en la conducta de los consumidores y hábitos alimentarios que las otras estrategias (suplementación y diversificación en la dieta) (Darnton-Hill y Nalubola, 2002). El enriquecimiento de los alimentos con compuestos de hierro está considerado como el mejor planteamiento a largo plazo para prevenir la deficiencia en hierro (Bothwell, 1999). Las ventajas que presenta incluyen, alcanzar a la mayoría de los segmentos de la población, y además no requerir la cooperación del individuo. Sin embargo, existen muchas dificultades que tienen que ser superadas cuando enriquecemos la dieta con hierro, principalmente la ausencia de una simple estrategia de enriquecimiento que sea viable para su uso a escala mundial. Por lo tanto, los programas de enriquecimiento con hierro tienen que ser desarrollados específicamente para cada país o región teniendo en cuenta los hábitos dietéticos de los grupos o poblaciones seleccionadas. La evaluación de los hábitos dietéticos es bastante importante para la selección de un apropiado alimento para su enriquecimiento. Después de que se haya sido seleccionado el alimento, tiene que ser determinado el tipo de compuesto de hierro más adecuado, teniendo en cuenta el almacenamiento del alimento y la preparación del mismo en la región o población seleccionada. Además, es importante evaluar su aceptabilidad dentro de la población seleccionada. Por último se debe determinar su absorción y su efecto sobre el estado nutricional en un estudio a largo plazo (Cook y Reusser, 1983; Walter y col, 2001).

Los alimentos más utilizados para el enriquecimiento son las harinas de cereales. El hierro añadido a las harinas de elevada extracción se absorbe muy poco debido a la

presencia de fitatos y otros inhibidores de la absorción del hierro (Hurrell y col., 2002; Hurrell y col., 2004). El sulfato ferroso desecado puede ser usado en harina de trigo, que es consumida poco después de ser molida, aunque en la mayoría de los países en vías de desarrollo la harina es almacenada durante periodos de tiempo más largos. Por tanto, los polvos de hierro elemental, los cuales son menos reactivos, son ampliamente utilizados, a pesar de su baja biodisponibilidad (Hurrell y col., 2002; Swain y col., 2003; Zimmerman y col., 2005). Resultados de un estudio de eficacia en Tailandia sugieren que las dos formas de hierro elemental, hierro electrolítico y el hierro reducido por hidrogeno, podrían ser útiles para el enriquecimiento; sin embargo su biodisponibilidad frente a la del sulfato ferroso es del 50-79% (Zimmerman y col., 2005). Otras dos formas de hierro reducido, el reducido por monóxido de carbono y el hierro reducido por atomización, presentan una baja absorción y poca probabilidad de ser utilizados en el enriquecimiento de alimentos. En un estudio llevado a cabo en Chile se observó que el enriquecimiento de la harina de trigo en una concentración de 30 mg/Kg contribuyó al descenso de la deficiencia en hierro (Hertrampf, 2002). El enriquecimiento de la harina de maíz en Sudáfrica con fumarato ferroso fue eficaz en el descenso de la anemia, y en la mejora del estatus del hierro y en el desarrollo motor de los niños de corta edad (Faber y col., 2005). El ácido etilendiaminotetracético hierro sodio (NaFeEDTA) presenta una elevada eficacia como compuesto de hierro en el enriquecimiento del azúcar en Guatemala (Viteri y col., 1978), polvo de curry en Sudáfrica (Ballot y col., 1989), salsa de soja en China (Huo y col., 2002), salsa de pescado en Vietnam (van Thuy y col., 2003) y harina de maíz en Kenia (Andago y col., 2007). El NaFeEDTA se absorbe de 2 a 3 veces más que el sulfato ferroso en presencia de dietas con un elevado contenido en ácido fítico (Bothwell y MacPhail, 2004), sin embargo, sólo está permitido como aditivo alimentario en cantidades de 0.2 mg/día/Kg, limitando su utilidad como compuesto de hierro en el enriquecimiento de alimentos en recién nacido y en niños de corta edad (WHO, 1999). Dos son los compuestos de hierro particularmente útiles en el enriquecimiento de productos líquidos: el pirofosfato férrico micronizado (Fidler y col., 2004) y el bis-glicinato ferroso, un quelado de aminoácido (van Stuijvenberg y col., 2006). El uso del pirofosfato férrico micronizado, un compuesto de hierro de color blanco y con buena biodisponibilidad, ha permitido con éxito el enriquecimiento de alimentos sensibles a los cambios de color, tales como la sal de grado medio en África (Zimmermann y col., 2004; Wegmueller y col., 2006) y arroz en la India (Cook y col., 2005).

El bis-glicinato ferroso está formado por una molécula de hierro ferroso acoplado a dos moléculas de glicina. El hierro está unido al grupo carboxilo de la glicina por un puente aniónico, y a un grupo amino por una unión covalente, para formar dos anillos heterocíclicos (Figura 2)

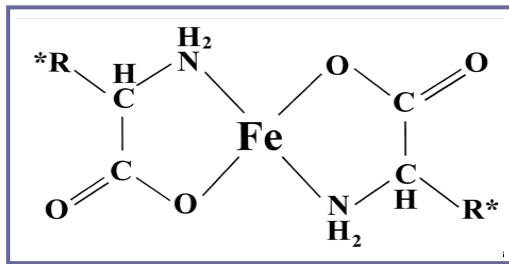


Figura 2. Estructura del bis-glicinato ferroso

Esta estructura puede proteger al hierro de las interacciones con los inhibidores dietéticos de la absorción del hierro, haciéndolo ideal para el enriquecimiento de los alimentos con un elevado contenido en antinutrientes tales como el ácido fítico (Allen, 2002b). Sin embargo, los estudios realizados demuestran contradicciones y la posibilidad de que diversos compuestos de la dieta puedan afectar a la absorción de este compuesto.

Olivares y col. (1997) compararon la absorción del hierro del bis-glicinato ferroso añadido al agua y a la leche, y concluyeron una absorción menor en la leche (11%) que cuando era añadido al agua (46%). Además, cuando el ácido ascórbico fue añadido a la leche la absorción del bis-glicinato ferroso incrementó en un 38%. Estos resultados sugieren que los inhibidores y favorecedores pueden afectar a la absorción del bis-glicinato ferroso. En otro estudio llevado a cabo por Fox y col. (1998) en niños alimentados con un puré de verduras o una papilla de cereales con un elevado contenido en ácido fítico y enriquecidas con bis-glicinato ferroso o sulfato ferroso marcados con isótopos estables, observaron que el ácido fítico disminuyó la absorción del hierro de igual manera en ambos compuestos de hierro. Bovell-Benjamin y col. (2000), compararon la absorción del hierro del bis-glicinato ferroso con la del sulfato ferroso añadidos a copos de maíz con un elevado contenido en ácido fítico en un grupo de individuos deficientes en hierro. La absorción del bis-glicinato ferroso fue de cinco a seis veces superior a la del sulfato ferroso (6-7% comparada con 1-2%, respectivamente). Cuando las dos fuentes de hierro fueron administradas conjuntamente en la misma comida los resultados fueron muy similares, indicando que no había un intercambio de los isótopos en el pool intestinal, y que la molécula de bis-glicinato ferroso probablemente se absorbía de una forma intacta.

En general, la ventaja de usar el bis-glicinato ferroso para enriquecer los alimentos es por su elevada absorción en alimentos con un elevado contenido en inhibidores de la absorción del hierro. Aunque hay algunas evidencias sobre la absorción intacta del bis-glicinato ferroso cuando entra en las células intestinales, la eficacia de la absorción del hierro aparentemente está regulada por el estado nutricional de hierro en el individuo. Otra ventaja que presenta este compuesto de hierro es que puede ser utilizado para enriquecer productos lácteos y una amplia variedad de productos comerciales, tales como cereales, galletas, bizcochos, y bebidas de frutas. Sin embargo posee un elevado potencial redox y por consiguiente una

elevada tendencia a causar oxidación lipídica. El bis-glicinato ferroso tiene un coste superior al sulfato ferroso, pero hay que tener en cuenta que debido a su elevada biodisponibilidad se podrían utilizar cantidades más pequeñas (Allen, 2002a).

5. BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO Y SU VALORACIÓN

La biodisponibilidad es una medida de la proporción total de hierro de un alimento o dieta que es digerido, absorbido, y metabolizado por las rutas metabólicas normales (Fairweather-Tait, 1987). Por lo tanto, la biodisponibilidad del hierro depende de la digestibilidad o mejor dicho, la *solubilidad* del hierro durante la digestión, la *absorción* del hierro y su liberación a la circulación, y la *metabolización* del hierro una vez que ha entrado en la circulación, y su incorporación a los componentes funcionales como la hemoglobina, citocromos, etc. Otras definiciones propuestas por otros autores se reflejan en la Tabla 6 (Wienk y col., 1999).

Tabla 6. Definiciones propuestas para la biodisponibilidad del hierro.

- ❖ Porción del hierro total que es metabolizado (Mahoney y Hendricks, 1982)
- ❖ Medida de la proporción del hierro total en un alimento o dieta que es digerido, absorbido, y metabolizado por las rutas metabólicas normales (Fairweather-Tait, 1987)
- ❖ Proporción del hierro total en un alimento, comida o dieta que es utilizado para las funciones normales del cuerpo (Fairweather-Tait, 1992)
- ❖ Porcentaje del hierro ingerido que llega a ser disponible para el proceso metabólico (Van Dokkum, 1992)
- ❖ Medida de la disponibilidad del hombre y animales, o la eficacia, por la que los nutrientes (hierro), en una forma química dada, son liberados del alimento en presencia de ciertos componentes del alimento. Además incluye la absorción y transporte del hierro a órganos y células, donde finalmente completa su función fisiológica (Schlemmer, 1995)

Actualmente, el hierro es el único micronutriente que presenta una medida directa de la biodisponibilidad ya que aproximadamente el 80 – 90% del hierro absorbido es utilizado para la síntesis de la hemoglobina en los reticulocitos. La biodisponibilidad puede ser medida como la proporción incorporada del compuesto de hierro a la hemoglobina, mediante isótopos marcadores. Sin embargo, debido a que no hay vías de excreción para el hierro, las medidas de la absorción son utilizadas para la predicción o estimación de la biodisponibilidad. Las técnicas de valoración de la biodisponibilidad del hierro se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7. Métodos para valorar la biodisponibilidad del hierro

- ❖ **Incorporación a la hemoglobina** (radioisótopos e isótopos estables)
- ❖ **Monitorización fecal hemoglobina** (radioisótopos e isótopos estables)
- ❖ **Contador corporal** (^{59}Fe)
- ❖ **Aparición/desaparición en plasma**
- ❖ **Repleción de la hemoglobina**

(Fairweather-Tait, 2001)

5.1. Incorporación a la hemoglobina

Este método se basa en marcar el compuesto de hierro en estudio con un radioisótopo (^{59}Fe o ^{55}Fe). El radioisótopo es administrado por vía oral a personas en ayunas en una o

más ocasiones y 14 días después de la última dosis se calcula el porcentaje de la incorporación del hierro a la hemoglobina (Brise y Hallberg, 1962a). También se suele emplear el método del doble isótopo para la obtención de los valores absolutos en vez de los relativos para la absorción del hierro (Saylor y Finch, 1953). Este método consiste en la administración por vía oral de ^{59}Fe y la administración simultánea por vía intravenosa del ^{55}Fe , tras 9 días se toma una muestra de sangre. La relación entre el ^{55}Fe y ^{59}Fe en sangre es la medida de la verdadera absorción del ^{55}Fe , a condición de que las distribuciones internas de los isótopos oral e intravenosa sean similares. Puede ser calculado como:

$$\% \text{ Absorción } ^{55}\text{Fe} = \frac{\text{radioactividad en la sangre del } ^{55}\text{Fe} \times \text{dosis inyectada del } ^{59}\text{Fe}}{\text{dosis oral del } ^{55}\text{Fe} \times \text{radioactividad en la sangre del } ^{59}\text{Fe}} \times 100$$

Una variación de este método es la utilización de ambos radioisótopos administrados por vía oral en días consecutivos y en diferentes comidas, permitiendo estimar la absorción del hierro comparativamente dentro de la misma persona (Bothwell y col., 1958; Pirzio-Biroli y col., 1958). Transcurridos 14 días se toma una muestra de sangre para calcular la absorción del hierro mediante la fórmula anteriormente mencionada (Wienk y col., 1999). Sin embargo, aunque no se dispone de pruebas de que las radiaciones ionizantes a las dosis que se aplican en los ensayos provoquen efectos perjudiciales en el hombre, existe una comprensible cautela al uso de isótopos radioactivos en ciertos grupos de población como niños y mujeres embarazadas (Barberá y Farré, 1992).

Frente a los isótopos radioactivos, los isótopos estables no presentan ningún riesgo para la salud a consecuencia de las radiaciones ionizantes y además no sufren decaimiento, por lo que las muestras marcadas pueden ser almacenadas indefinidamente. Estudios con ^{57}Fe y ^{58}Fe han sido utilizados frecuentemente para el estudio de la biodisponibilidad de diferentes compuestos de hierro añadidos a alimentos infantiles (Martínez, y col. 1998; Fox y col., 1998) o para ensayos diseñados en mujeres (Fidler y col., 2003; Diaz y col., 2003). Sin embargo, estos estudios no se hallan exentos de inconvenientes. En primer lugar, los isótopos estables son más caros y además las dosis necesarias para obtener un adecuado enriquecimiento con un isótopo estable pueden ser demasiado elevadas para ser considerado un marcador, especialmente en estudios realizados en adultos (Bothwell y col., 1979; Weaver, 1998).

5.2. Monitorización fecal

Debido a que las pérdidas endógenas de hierro a través de las heces son despreciables y la cantidad de hierro excretado por la orina es muy pequeña, este método puede ser utilizado para medir la verdadera absorción del hierro. Generalmente se utilizan isótopos

estables, donde las dosis son dependientes del sistema de detección y las cantidades necesarias para marcar los compuestos de hierro son menores comparadas con la técnica de la incorporación a la hemoglobina. Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes, primero la incompleta recogida de las heces, especialmente en personas con largos periodos de tránsito intestinal; y segundo, la recogida de las heces en periodos cortos de tiempo conduce a una sobreestimación en la absorción debida a la incompleta recuperación del isótopo no absorbido presente en el contenido del lumen y/o por una incompleta recogida de células de la mucosa que contiene el isótopo y que no se ha transferido a la circulación sanguínea (Fairweather-Tait, 2001).

5.3. Recuento corporal

Este método se basa en marcar con ^{59}Fe un alimento o un compuesto de hierro y administrarlo por vía oral. Tras un periodo corto de tiempo (~ 1h) se realiza el recuento del isótopo emitido por el organismo. El resultado total es considerado como el 100%. La cantidad de ^{59}Fe presente en el cuerpo descenderá sucesivamente debido a la excreción fecal. Después de un tiempo (10 a 14 días en humanos y de 5 a 7 días en ratas) se alcanza un estado constante. La diferencia entre ambas medidas (a la hora y a los 10 a 14 días) se considera una medida de absorción del isótopo. Solamente el ^{59}Fe puede ser usado para el recuento corporal, ya que el ^{55}Fe no emite radiación gamma (Fairweather Tait, 2001).

5.4. Aparición/Desaparición en el plasma

Las amplias variaciones diurnas del hierro plasmático restringen el uso de este parámetro como un método para medir la absorción del hierro de compuestos no marcados, excepto para elevadas dosis. Se han establecido planteamientos alternativos usando isótopos estables, validados frente a los métodos con radioisótopos (Barrett y col., 1994). Para cuantificar la absorción del hierro, se debe conocer el ritmo de renovación del hierro en el plasma, para ello se administra una dosis intravenosa del isótopo de hierro. Al mismo tiempo se administra otro isótopo diferente por vía oral. Las concentraciones de los isótopos en el plasma se calculan midiendo el área bajo la curva (Fairweather-tait, 2001) según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Absorción oral} = [(ABC_{\text{oral}} / ABC_{\text{iv}}) \times (\text{dosis}_{\text{iv}} / \text{dosis}_{\text{oral}})] \times 100$$

donde ABC_{oral} es el área bajo la curva del isótopo administrado vía oral y ABC_{iv} el área bajo la curva del isótopo administrado vía intravenosa.

5.5. Repleción de la hemoglobina

Es uno de los métodos más empleados para estimar la biodisponibilidad del hierro en ratas, estando recomendado por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, 1990).

Este método parte de un grupo de ratas jóvenes, machos, las cuales son deplecionadas de sus reservas de hierro mediante una dieta deficiente en este mineral hasta provocarles una anemia. Después de un mínimo de cuatro semanas en depleción, las ratas son divididas en grupos similares, según peso y niveles de hemoglobina, y cada grupo recibe una dieta que contiene el compuesto de hierro en estudio, en diferentes concentraciones. La repleción de la hemoglobina se mide en comparación a la de la fuente de hierro de referencia, el sulfato ferroso que se administra a otros grupos de ratas. Los niveles de hemoglobina son medidos después de 2 semanas de repleción y estos valores son representados frente a las diferentes concentraciones del hierro dietético para cada fuente de hierro. De esta manera, obtenemos dos rectas de regresión, una para el compuesto en estudio y otra para la sal de referencia (el sulfato ferroso). La relación entre las pendientes obtenidas refleja una medida cuantitativa de la biodisponibilidad del compuesto de hierro en estudio. El valor de la *biodisponibilidad relativa (VBR)* de la fuente de hierro se expresa relativo al efecto del sulfato ferroso (Wienk y col., 1999).

Mediante la repleción de la hemoglobina de ratas anémicas se puede determinar también la biodisponibilidad del hierro de diferentes compuestos calculando la *eficiencia de la regeneración de la hemoglobina* (Mahoney y Hendricks., 1982; Zhang y col., 1989) El método de la eficiencia de la regeneración de la hemoglobina cuantifica la biodisponibilidad del hierro como la cantidad de hierro en la hemoglobina que se gana durante el periodo de repleción (Anderson y col., 1972; Mahoney y col., 1974), para ello utiliza un diseño semejante al escrito para la determinación de la VBR, pero emplea una sola dosis del compuesto de hierro en estudio. La cantidad de hierro en la hemoglobina se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\text{FeHb (mg)} = \text{Hb (mg/l)} \times \text{peso (Kg)} \times \text{Contenido hierro Hb (\%)} \times \text{Volumen de sangre (\% en peso)}$$

El volumen de sangre en ratas en crecimiento es alrededor del 7.5% de su peso corporal, tanto para animales anémicos como para animales recuperados de una anemia deficiencia en hierro (Whittaker y col., 1984). La hemoglobina contiene un 0.335% de hierro y este valor se puede aplicar tanto para calcular la cantidad de hierro en la hemoglobina inicial como final durante el periodo de repleción. La *eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH)* puede ser calculada para cada grupo de animales conociendo sus pesos iniciales y finales, sus concentraciones de hemoglobina iniciales y finales, la cantidad de alimento consumido, y la concentración de hierro del alimento (Mahoney y Hendricks, 1982).

$$\text{ERH} = [(\text{Fe-Hb}_{\text{final}} - \text{Fe-Hb}_{\text{inicial}}) / (\text{Ingesta de hierro}_{\text{final} - \text{inicial}})] * 100$$

6. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LOS FOLATOS

6.1. Estructura química y nomenclatura de los folatos

La Unión Internacional de Química Aplicada y Pura – Unión Internacional de Bioquímica, en inglés (IUPAC-IUB) junto a la Comisión sobre la Nomenclatura Química (JCBN) fue el encargado de establecer las recomendaciones sobre la nomenclatura de los folatos (Bakley, 1988). Esta nomenclatura es complicada debido a múltiples formas posibles que existen. Teóricamente existen más de 150 formas diferentes de folatos (Baugh & Krumdieck, 1971), aunque probablemente menos de 50 formas estén presentes en los tejidos animal y vegetal (Gregory, 1989).

Todos los folatos están formados por un esqueleto de ácido 4-[(pteridina-6-metil)amino] conjugado con el L-ácido glutámico (Figura 3), a menudo abreviado como “pteroato” (Pte) o ácido pterico. Pteroato puede además estar dividido en unidades más pequeñas formadas por un anillo de pteridina y p-aminobenzoato (pABA) (Eitenmiller & Landen, 1999). Las diferentes estructuras de los folatos pueden estar divididas en cuatro caracteres principales que dan a los folatos sus únicas propiedades:

a) Los folatos difieren en los niveles de reducción del anillo de pteridina. Los folatos que presentan los anillos de pteridina completamente reducidos (Figura 3d) son denominados “Tetrahidrofolatos”, aquellos que están parcialmente reducidos (Figuras 3b y 3c) son denominados “dihidrofolatos”, y aquellos completamente oxidados son denominados “ácido fólico” (Figura 3a).

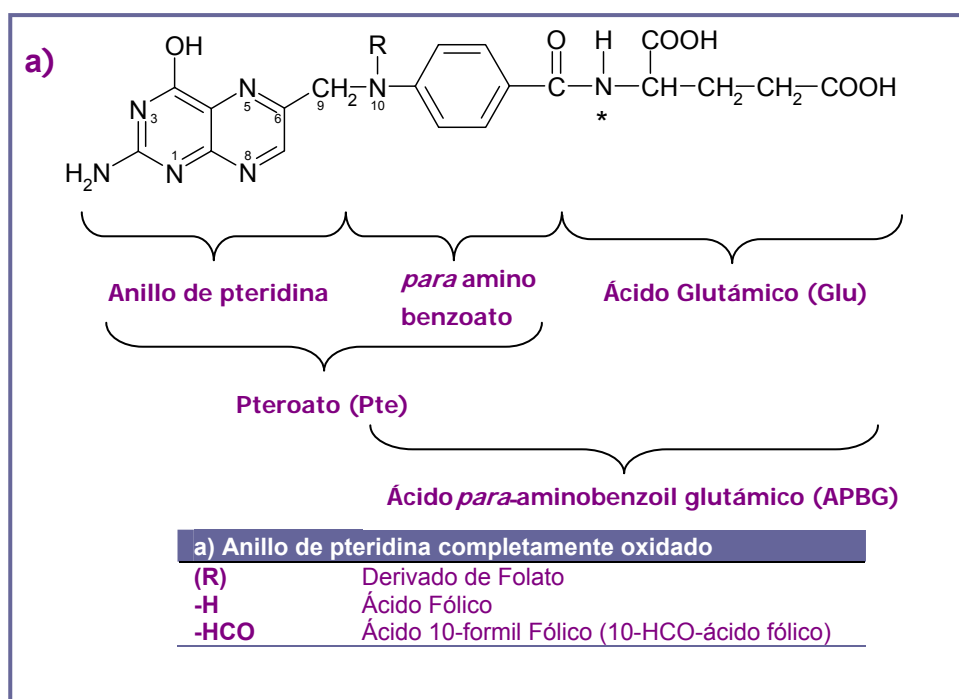
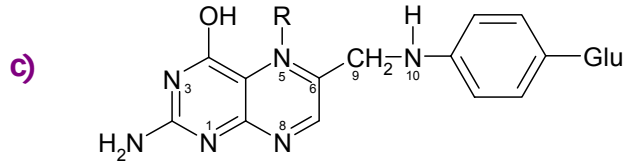
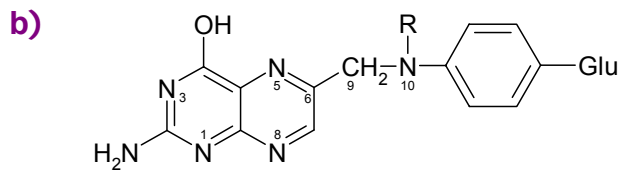
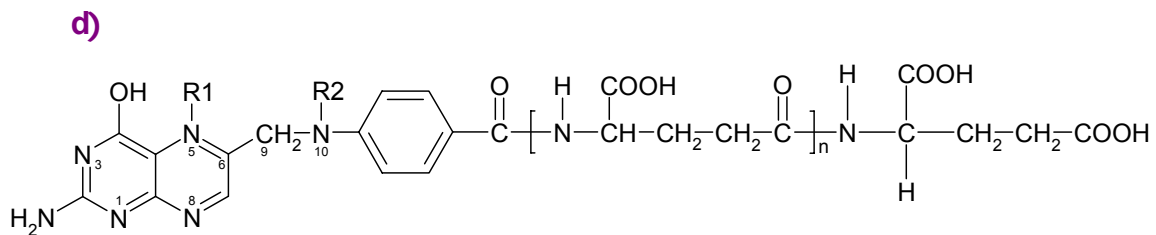


Figura 3a. Estructura del ácido fólico



b y c) Anillo de pteridina parcialmente oxidado

b) (R)	Derivados de Folatos
-H	Dihidrofolato (H ₂ folato)
-HCO	10-formildihidrofolato (10-HCO-H ₂ folato)
c) (R)	
-CH₃	5-metildihidrofolato (5-CH ₃ -H ₂ folato)
-HCO	5-formildihidrofolato (5-HCO-H ₂ folato)



d) Anillo de pteridina completamente reducido

Sustituyente (R1)	Sustituyente (R2)	Derivados de folatos
-H	-H	Tetrahydrofolato (H ₄ folato)
-CH₃	-H	5-metiltetrahydrofolato (5-CH ₃ -H ₄ folato)
-CH=NH	-H	5-formiminotetrahydrofolato (10-NHCH-H ₄ folato)
-HCO	-H	5-formiltetrahydrofolato (5-CHO-H ₄ folato)
-H	-HCO	10-formiltetrahydrofolato (10-CHO-H ₄ folato)
Enlace R1-R2		
	-CH₂	5,10-metilentetrahydrofolato (5,10-CH ₂ -H ₄ folato)
	-CH⁺=	5,10-meteniltetrahydrofolato (5,10-CH ⁺ =H ₄ folato)

Figuras 3 b, c y d. Diferentes estructuras de los folatos

b) Los folatos pueden diferenciarse en los sustituyentes localizados en la posición N-5 y N-10 del anillo de pteridina, los cuales pueden ser el hidrógeno (-H), grupo metil (-CH₃), grupo formil (-HCO), grupo formimino (-NHCH), grupo metenil (CH⁺) y el grupo metileno (-CH₂).

Los derivados de folatos son nombrados dependiendo de la naturaleza del sustituyente y del nivel de reducción del anillo de pteridina. Por ejemplo, un tetrahidrofolato, dihidrofolato y un folato completamente oxidado con un radical $-HCO$ en la posición N-10 es denominado 10-formiltetrahidrofolato (10-HCO- H_4 folato), 10-formildihidrofolato (10-HCO H_2 folato) y ácido 10-formilfólico (ácido 10-HCO fólico) (Figuras 3 a, b, d).

c) El L-glutamato puede estar conjugado en repetidas unidades unidas por un γ -enlace con el grupo carboxilo. Estos glutamatos son denominados, diglutamatos y triglutamatos, dependiendo del número de residuos. Por ejemplo, 5-metiltetrahidrofolato con 3 residuos de glutamato se denomina 5-metiltetrahydropteroyltriglutamato (5- CH_3 - H_4 PteGlu $_3$). Algunas veces el término folato poliglutamatos es usado, y hace referencia a todos los folatos con más de un residuo de glutamato sin tener en cuenta cualquier particular sustituyente.

d) En cuarto lugar, todos los folatos completamente reducidos derivados del tetrahidrofolato tienen dos centros quirales. Estos centros son el α -C en la molécula del ácido glutámico y el átomo de C en la posición 6 del anillo de pteridina. Por lo tanto, existen cuatro diastereoisómeros [6S, α S], [6S, α R], [6R, α S] y [6R, α R]. La forma biológicamente activa del diastereoisómero es [6R, α S] para el tetrahidrofolato (H_4 folato), 5-metiltetrahidrofolato (5- CH_3 - H_4 folato) y 5-formiltetrahidrofolato (5-HCO- H_4 folato) (Groehn & Moser, 1999).

Aunque los folatos reducidos son sintetizados por plantas y la mayoría de los microorganismos (Green y col., 1996; Hanson y Gregory., 2002; Basset y col., 2005), el ácido fólico no se encuentra en la naturaleza. Su existencia depende de la oxidación de los folatos reducidos o de su síntesis comercial para el uso en suplementos y en alimentos enriquecidos (Quinlivan y col., 2006).

Actualmente se está empezando a utilizar de forma alternativa al ácido fólico, la forma sintética del 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) para el enriquecimiento de alimentos sólidos, semi-líquidos y líquidos. Es la sal cálcica del 5-metiltetrahidrofolato ((6S)-5-MTHF), la cual tiene como fórmula química $CaC_{20}H_{23}N_7O_6$ (Figura 4). Es un polvo cristalino, blanquecino, casi ausente de olor, con escasa solubilidad en agua y ligeramente soluble o insoluble en casi todos los solventes orgánicos.

El (6S)-5-MTHF es un “Nuevo Ingrediente”, que ha sido descubierto para suplir a la forma natural de folatos que está de forma predominante en la naturaleza, L-Metilfolato (L-MTHF) (EFSA, 2004). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha emitido y publicado una evaluación científica favorable relativa a la sustitución en el encabezamiento de la categoría de «ácido fólico», a fin de tener en cuenta la inclusión de otras formas de folato, en los

anexos de la Directiva 2002/46/CE (Directiva 2006/37/CE de la Comisión de 30 Marzo de 2006). Por tal motivo, en aquellos productos enriquecidos con ácido fólico, el encabezamiento de esta vitamina deberá ser “folato” y en el caso que se adicione la forma L-metilfolato cálcica, deberá ser especificado como tal.

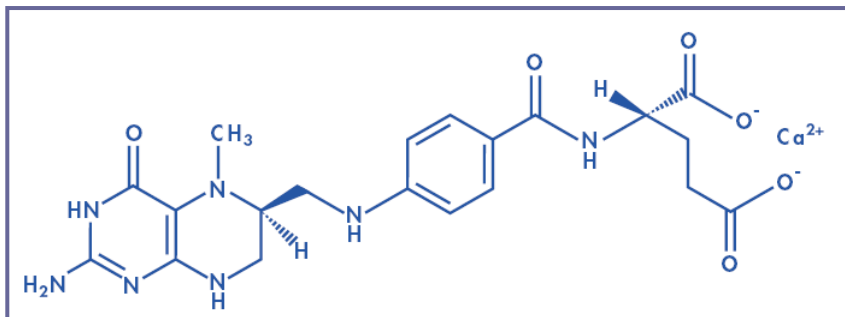


Figura 4.- Estructura química de la sal cálcica del L-5-MTHF.

6.2. Los folatos en la salud humana

Los folatos, así como varias formas de tetrahidrofolatos (THF), son substratos y coenzimas en la adquisición, transporte, y procesos enzimáticos de unidades de un átomo de carbono para el metabolismo de aminoácidos y ácido nucleicos y su regulación metabólica (Bailey, 1995; Cook, 2001) (Figura 2). Los folatos además de donar unidades de un átomo de carbono para la metilación de la homocisteína a metionina, la cual es empleada en reacciones de metilación celular y síntesis de proteínas. Los folatos están implicados en la síntesis de purinas y timidilatos, además de la interconversión de glicina a serina y en la rotura de la histidina para formar glutamato (Quinlivan y col., 2006).

Existe una estrecha relación entre un inadecuado estado nutricional para los folatos, una elevada concentración de homocisteína, y el riesgo de enfermedad coronaria, trombosis venosa, estenosis carotídea y otras enfermedades vasculares (Bailey, 1995; Robinson y col., 1998; Rimm y col., 1998). Además una deficiencia de folatos está asociada con un aumento en el riesgo de serios defectos en el nacimiento: “Defectos del tubo neural” (DTN) (Bjorklund y Gordon, 2006; Botto y col., 1999; Czeizel y Dudas, 1992; Laurence y col, 1981; Medical y col, 1991). Las tasas de los DTN varían dependiendo del área geográfica, estatus socioeconómico y raza (Pitkin, 2007). Por ejemplo, en Europa (excluyendo al Reino Unido e Irlanda) la prevalencia de DTN es alrededor de 10 casos por cada 10000 embarazos (Busby y col., 2005) mientras que en una región de China la prevalencia fue de 1387 casos por cada 10.000 embarazos, siendo una de las más altas prevalencias en el mundo (Li y col., 2006).

El riesgo de cierto tipo de cáncer (como el colon, cervical, y pulmón) además incrementa cuando la ingesta de folatos es insuficiente (Kim, 1999; Choi y Mason., 2000). La deficiencia de folatos puede también contribuir a la depresión (Fava y col., 1997; Green y Miller, 1999),

afectar el sistema inmune (Green y Miller., 1999), y provocar daños neuronales y neurológicos (Green y Miller., 1999; Houston y col., 1999; Snowdon y col., 2000).

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de homocisteína en plasma están muy relacionados con el estado nutricional de los folatos, es decir, una acumulación de homocisteína tiene lugar si el estatus de los folatos en el organismo es bajo como consecuencia de una reducción en el ciclo de la metionina. Los elevados niveles de homocisteína son un factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Lucock, 2000; Refsum y col., 1998; Scott y Weir, 1996; Selhub y col., 1996; Wald y col., 1998). Sin embargo hay que tener en cuenta que los elevados niveles de homocisteína pueden ser el resultado de otras deficiencias de vitaminas del grupo B, como la vitamina B12 o B6 (Refsum y col., 1998; Selhub y Rosenberg, 1996) o debido a la homocistinuria. La homocistinuria tiene lugar por una deficiencia de la enzima metionina sintetasa que es la encargada de catalizar la transferencia de un grupo metilo desde el 5-CH₃THF a la homocisteína, dando lugar a THF y metionina (Figura 5) (Refsum y col., 1998; Swanson y col., 2001). Los folatos participan en procesos bioquímicos que implican la transferencia de grupos de carbono, entre ellos se incluye el metabolismo de aminoácidos y síntesis de purinas y pirimidinas que son incorporadas al ADN y ARN (Figura 5, reacción 1) (Bailey y col., 2001).

Los folatos están implicados en la remetilación de la homocisteína para formar metionina (Figura 5, reacción 2), que posteriormente es transformada a S-Adenosilmetionina, el cual será el principal suministrador de grupos metilo- en un número considerable de reacciones químicas incluyendo la metilación del ADN, ARN, proteínas, fosfolípidos y neurotransmisores (Figura 5, reacción 3).

El interés actual en la investigación de la nutrición de los folatos incluye el efecto de las variaciones genéticas que influyen en la utilización de los mismos folatos. Varios polimorfismos en un único nucleótido asociado con el metabolismo de los folatos han sido identificados, el más estudiado hasta la fecha es la variante 677C3T metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima cataliza la conversión del 5,10 metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato (Figura 5, reacción 4), la cual sirve como donador de un átomo de carbono a la homocisteína para formar metionina. Los individuos que son homocigóticos para este polimorfismo pueden tener una actividad de la enzima MTHFR hasta un 50% más bajo comparado con aquellos que no lo tienen (Kang y col., 1988; Bailey y Gregory, 1999). Este polimorfismo aumenta el riesgo de una hiperhomocisteinemia cuando va asociado un bajo estatus para el folato (Jacques y col., 1996; Kauwell y col., 2000), el cual apoya la sugerencia que los individuos que son homocigóticos para el polimorfismo 677C3T tienen un requerimiento más elevado para los folatos (Rosenberg y Rosenberg, 1998).

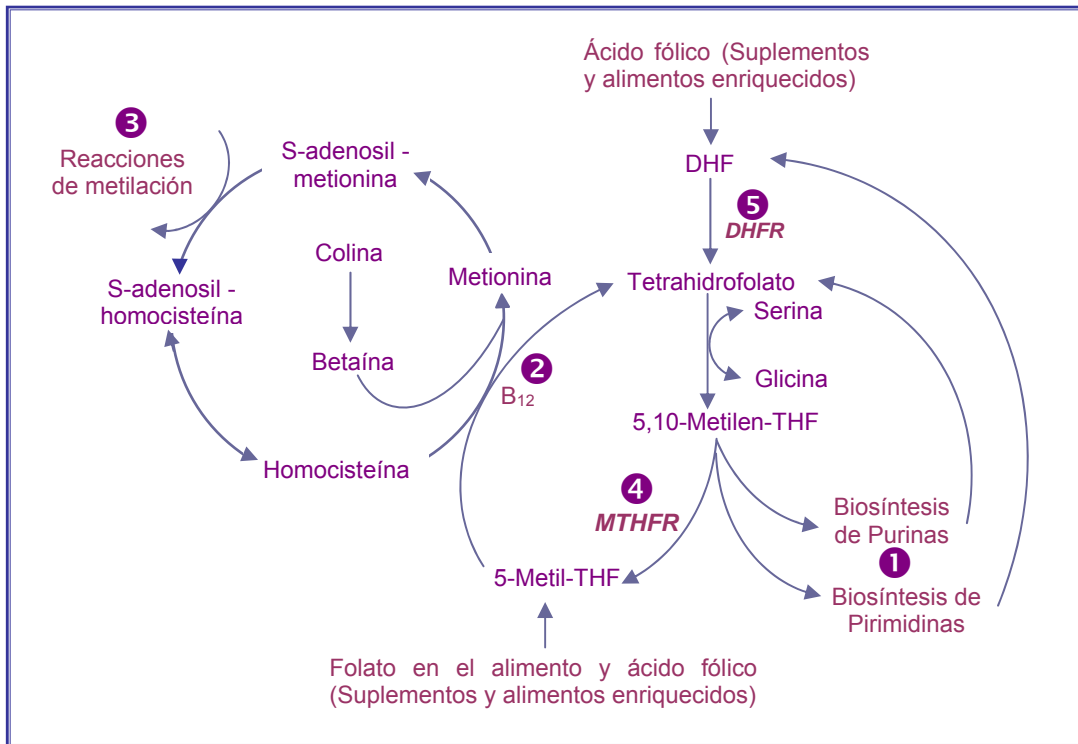


Figura 5. Componentes principales del ciclo bioquímico de los folatos. Abreviaturas: DHFR = Dihidrofolato reductasa; MTHFR = Metilentetrahidrofolato reductasa. Reacciones: 1. Biosíntesis de nucleótidos para la incorporación en el ADN y ARN; 2. Remetilación de la Homocisteína para formar Metionina (Vitamina B₁₂ actúa como coenzima); 3. Reacciones de metilación, incluyendo ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas; 4. MTHFR, cataliza la formación del 5-metil-THF necesario para las reacciones de metilación; 5. Dihidrofolato reductasa.

6.3. Metabolismo de los folatos

6.3.1. Absorción

Los folatos presentes de forma natural en los alimentos se encuentran en forma poliglutámicas, las cuales deben ser hidrolizadas hasta monoglutámicas en el intestino, previamente a su absorción (Gregory, 1996; Ball, 1998). Esta hidrólisis está catalizada por la enzima pteroilglutamato hidrolasa (conjugasa), localizada en el borde en cepillo de la mucosa intestinal (Figura 6). Reisenauer y Halsted (1987) calcularon que el contenido de pteroilglutamato hidrolasa en el borde en cepillo es elevado. Ciertos factores en los alimentos, tales como la fibra dietética y algunos ácidos orgánicos, por ejemplo en el zumo de naranja y tomates, pueden inhibir la desconjugación de poliglutamatos (Wei y col. 1996, Wei y Gregory 1998, Bailey y col 1988, Keagy y col. 1988), afectando a la absorción.

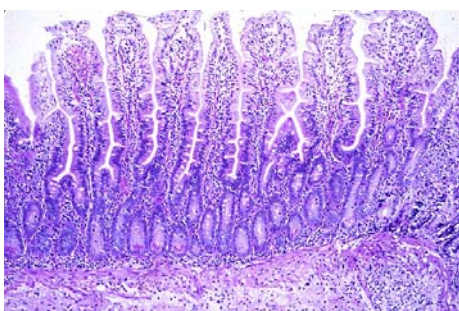


Figura 6. Mucosa yeyunal normal que muestra las vellosidades intestinales. En el extremo apical se localiza la enzima γ -glutamihidrolasa o folato conjugasa.

Los folatos presentes como monoglutamatos no necesitan ser hidrolizados, de tal forma que su paso a través de la membrana intestinal involucra a un transportador de folatos, pH dependiente. Incluso a altas concentraciones de folatos la absorción puede tener lugar mediante un mecanismo saturable que involucra difusión pasiva (Gregory, 1995) (Figura 7). Sin embargo, el ácido fólico tiene que ser hidrolizado hacia DHF y finalmente a la forma MTHF.

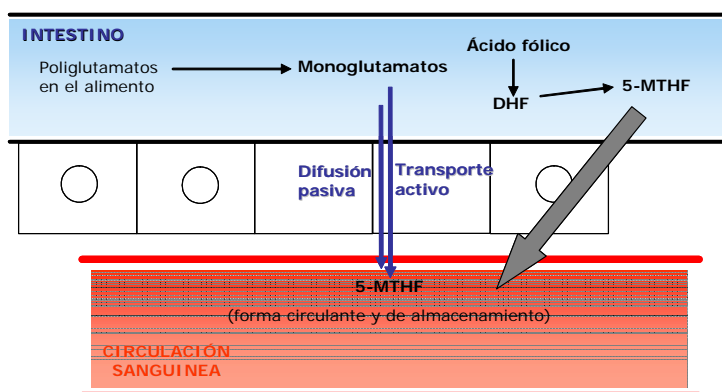


Figura 7.- Hidrólisis y absorción de folatos.

Este mecanismo explica la absorción del folato libre de la dieta, sin embargo, en la leche está fundamentalmente unido a una proteína y éste complejo proteína-folato es absorbido intacto en gran parte en el ileon, por un mecanismo diferente al sistema de transporte activo de absorción del folato libre. Por ello, la disponibilidad biológica del folato en la leche o del folato de las dietas a las cuales se les ha añadido leche es considerablemente mayor que el folato libre (Verwei y col., 2003).

Además, la transformación de ácido fólico en su forma activa, L-MTHF, es un paso crítico ya que esta conversión frecuentemente se ve interrumpida por numerosos factores intrínsecos al individuo como son: la edad, el metabolismo y la genética. Un 40% de los adultos se ven afectados por defectos genéticos que pueden limitar la cantidad de ácido fólico que se transforma a folato activo, el cual neutraliza la homocisteína (Gregory, 1995).

Si tenemos en cuenta que el ácido fólico tiene que ser primero transformado en la forma activa para poder ser absorbido y utilizado, la forma sintética (6S)-5-MTHF permite su paso directo a la circulación y al resto del organismo sin transformación previa (Pietrzik y col., 2001),

6.3.2. Transporte

Una vez absorbido y dentro de la célula entérica, el ácido pteroilglutámico se transforma en THF, gracias a la dihidrofolato reductasa, metilándose posteriormente y dando el 5-MTHF que pasa al torrente sanguíneo. El 5-MTHF alcanza la vena portal, y llega al hígado donde

aproximadamente del 10-20 % de los folatos absorbidos son retenidos, mientras que el resto circula a otros tejidos (Gregory, 1995).

Una vez los monoglutamatos están en sangre, se dirigen a hígado donde son de nuevo transformados en poliglutamatos, los cuales pueden ser reenviados a sangre o a bilis. El hígado y las células rojas de la sangre son los principales tejidos de almacenamiento para los folatos. El hígado almacena el folato en forma reducida y conjugada o lo convierte en MTHF que es secretado en la bilis y reabsorbido en la mucosa intestinal, estando disponible para los tejidos extrahepáticos. En humanos el contenido de folatos totales en el organismo es de 5-10 mg, de los cuales la mitad residen en el hígado en forma de tetra-, penta-, hexa- y heptaglutamatos del 5-MTHF y 10-HCO-THF (Combs, 1992; Herbert y Das, 1994). Los tejidos extrahepáticos acumulan folato a concentraciones por encima del plasma por desmetilación y formación de poliglutamatos (Herbert y Das, 1994).

Como se ha comentado anteriormente, después de la absorción, el 5-MTHF llega a la circulación portal. Muchos de estos folatos son captados por el hígado, aunque algunos llegan a la bilis donde son recirculados por el ciclo enterohepático.

Los glóbulos rojos contienen niveles más altos de folatos que en plasma, y prácticamente todos los folatos que se encuentran en los eritrocitos son las formas poliglutámicas del 5-MTHF. Por tanto, el L-MTHF es la forma predominante en plasma y en el transporte a los tejidos, siendo el único que puede atravesar la barrera cerebro-encefálica. Estas características positivas de esta forma de folato, se pueden extrapolar al (6S)-5-MTHF. El nivel de folatos en eritrocitos es uno de los parámetros más usados para medir a largo plazo el estado de folatos en el organismo. La concentración de folatos en plasma es también un buen indicador del estado de los folatos en el organismo aunque puede estar influenciado por la ingesta diaria de folatos en la dieta (Ratnam y Freisheim, 1990).

6.3.3. Excreción

Los folatos se filtran en el glomérulo y son reabsorbidos en el túbulo renal proximal (Whitehead, 1986). La mayor parte de los folatos secretados son reabsorbidos. La limpieza renal de los derivados de los folatos es inversamente proporcional a sus afinidades por las proteínas específicas de unión de los folatos en los túbulos proximales del riñón (Birn y col., 1993). Como se describe abajo, también la orina posee derivados de los folatos (Williams y col., 1982).

La excreción biliar de los folatos se estima en unos 100 µg/día en humanos (FAO/OMS, 2002). Muchos de estos folatos serían reabsorbidos a nivel del intestino delgado, existiendo una excreción fecal. Sin embargo la excreción de folatos en heces es variable y no se utiliza

como una medida de disponibilidad debido a la biosíntesis de folatos por medio de la flora intestinal. Estudios en animales, a los cuales se les administró un tratamiento con drogas sulfatadas para producir una deficiencia completa de folatos, se demostró que la síntesis bacteriana de folatos contribuye a su almacenamiento hepático, aunque no se ha cuantificado el alcance de ésta contribución. Las pérdidas de folatos por vía biliar y fecal pueden verse incrementadas cuando hay problemas de absorción intestinal (Gregory y col., 1995).

6.4. Enfermedades relacionadas con la deficiencia de folatos

6.4.1. Enfermedades cardiovasculares

Numerosos estudios han relacionado el riesgo de enfermedad cardiovascular con altos niveles de homocisteína en plasma (Selhub y col., 1995; Verhoef y col., 1996; Verhaar y col., 2002; Refsum y col., 2004; Pintó y col., 2005). Aumentando la ingesta de ácido fólico así como de folatos del alimento disminuyen los niveles de homocisteína en plasma y por tanto el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Jacob y col., 1994; Ubbink 1997, Brattström y col., 1998, Brouwer y col., 1999a, Brouwer y col., 1999b, Riddell y col., 2000). Boushy y col. (1995) descubrieron que un descenso de 5 $\mu\text{mol/l}$ en los niveles de homocisteína puede resultar en una disminución del 40% en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, en sujetos con niveles inicialmente altos de homocisteína en plasma ($>16 \mu\text{mol/l}$). En sujetos con niveles de homocisteína normales, una ingesta adicional de 250 μg ácido fólico/día puede resultar en una disminución del 10% en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Van't Veer y col., 1997). Brouwer y col., (1999) disminuyeron en un 15% los niveles de homocisteína en plasma después de una ingesta adicional de 250 μmol ácido fólico/día o una ingesta adicional de 350 μmol folatos dietéticos/día.

6.4.2. Anemia megaloblástica

La anemia megaloblástica es una alteración sanguínea caracterizada por la presencia de megaloblastos en médula ósea y macrocitos en sangre periférica, lo cual puede venir acompañado de una o más citopenias. La megaloblastosis es considerada como la consecuencia morfológica de aquellas alteraciones químicas que provocan el enlentecimiento de la síntesis del ADN, con una síntesis relativamente normal del ARN (De Paz, 2006). Dichas alteraciones químicas se deben, generalmente, a la deficiencia, ya sea absoluta o relativa, de ciertas sustancias necesarias para la hematopoyesis normal. Se ha podido comprobar que un alto porcentaje de esta anomalía (aproximadamente el 95%) es provocado por la deficiencia de folatos, cobalaminas o de ambas, aunque estos síntomas pueden aparecer también como consecuencia de leucemias agudas y debido a la acción de agentes mielodisplásicos.

Existen diversas causas de deficiencia de folatos relacionadas con la anemia megaloblástica:

a) Dieta insuficiente. La anemia megaloblástica debida a la deficiencia de folatos en la dieta afecta a personas con consumo crónico de alcohol, con anomalías mentales y en algunos casos de malnutrición proteica, estados de pobreza y de falta de atención en personas de edades avanzadas pueden llevar también a una deficiencia de folatos y por tanto a una posible anemia megaloblástica (Green y col., 2005).

b) Malabsorción intestinal. En algunos casos, se ha sugerido la inhibición de la hidrolasa intestinal por algunos fármacos como causa de la malabsorción de folatos, aunque este mecanismo no ha podido ser demostrado. Son más frecuentes aquellos cuadros en los que la malabsorción es secundaria a anormalidades en la mucosa intestinal, como en el caso del *Sprue tropical*, la *enfermedad de Crohn* (enteritis regional), *enfermedad de Whipple*, la esclerodermia, la amiloidosis y la diverticulitis del intestino delgado. En la *resección quirúrgica del estómago o atrofia de la mucosa gástrica*, se produce una absorción inadecuada de folatos por la aclorhidria secundaria. Determinados fármacos pueden interferir en la absorción de folatos (De Paz, 2006).

c) Aumento de las necesidades de folatos. Existen determinantes situaciones en las que se ven aumentadas las necesidades de folatos, como en el embarazo y en los primeros meses de vida. Este incremento en las necesidades de folatos puede llevar a una deficiencia grave en personas que se encuentren en el límite de sus requerimientos dietéticos diarios (RDI). La anemia megaloblástica debida a la deficiencia de folatos se detecta después de 36 semanas de embarazo. Debido a la suplementación de folatos antes y durante el embarazo, la prevalencia de anemia megaloblástica es menor. En países subdesarrollados, donde la ingesta de folatos diaria es inadecuada y sin una adecuada suplementación durante la gestación, la prevalencia de anemias megaloblásticas es del 50%. En los recién nacidos prematuros los requerimientos de folatos son más elevados que los de un recién nacido a término, debido a su rápido crecimiento durante los 2-3 primeros meses, pudiendo aparecer una posible anemia megaloblástica a las 4-6 semanas de vida. En los ancianos, al carecer de una dentadura adecuada, generalmente no pueden tomar verduras frescas o alimentos crudos, y muchas veces la dieta se basa en conservas enlatadas. Se estima que entre el 10-30% de las personas mayores de 50 años presentan una capacidad reducida de absorber vitamina B₁₂ (Farhan y col., 2005). En los niños, el déficit de folatos se observa con más frecuencia en los prematuros y tras dietas exclusivas basadas en leche de cabra, cuyo contenido en folatos es muy bajo, o la utilización de sustitutos lácteos sin suplementos vitamínicos (De Paz, 2006).

6.4.3. Defectos del tubo neural

Durante el desarrollo embrionario se produce el cierre del tubo neural en torno a las 6 semanas tras la concepción. Los llamados defectos del tubo neural (DTN) se producen como consecuencia de alteraciones en el cierre del mismo, y pueden tener lugar a dos niveles: cerebro y columna vertebral. Este defecto a nivel del cerebro da lugar a la *anencefalia* y al *encefalocele*, y a nivel de la columna vertebral constituye la *espinas bífida* (Lijun Pei y col., 2005). Numerosas investigaciones han demostrado que durante la preconcepción y estado prenatal adiciones de ácido fólico pueden reducir satisfactoriamente la incidencia de DTN (Hasenau, Susan y col., 2002).

Estudios de intervención muestra que el tratamiento con 400 µg ácido fólico en mujeres en estado de gestación reducen el riesgo de tales defectos (MRC Vitamin Study, 1991; Reynolds, 2002).

6.5. Valoración del contenido de folatos en los alimentos

La valoración del contenido de folatos en los alimentos no resulta sencilla. Todos los métodos disponibles poseen limitaciones ya que existen ciertas formas químicas derivadas que pueden no ser cuantificadas y en otros casos se sobrestima sobre la realidad del contenido. De modo sencillo podemos dividir los métodos en microbiológicos y cromatográficos.

6.5.1. Métodos analíticos

6.5.1.1. Método microbiológico

El método microbiológico está basado en el uso de un microorganismo que necesita los folatos para crecer. Teóricamente su crecimiento es logarítmicamente proporcional al contenido de folato en la muestra (Martín, 1995). La bacteria más utilizada en el método microbiológico es el *Lactobacillus rhamnosus*, y actúa sobre todos los derivados de folatos encontrados en el alimento, a diferencia de muchas otras bacterias investigadas (Eitenmiller y Landen, 1999). Este es el método Oficial aprobado por la "Association of Official Analytical Chemists", AOAC, que permite valorar el contenido de folatos totales en alimentos. Hoy en día es el único método reconocido por la AOAC (AOAC, 2000) para el análisis y cuantificación del ácido fólico en la preparación de vitaminas y fórmulas infantiles. Por su comodidad es el método utilizado de forma usual (Arcot y Shrestha, 2005). El crecimiento microbiano se basa en los requerimientos nutricionales de los microorganismos por los folatos. Con un pH apropiado el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* es igual en todos los folatos mono-, di- y tri-glutamatos aunque no responde ante los ácidos pteróicos, producto común de la degradación de los folatos (Martín, 1995). No obstante, ciertos

compuestos pueden estimular o inhibir el crecimiento bacteriano dando lugar a resultados no reales.

6.5.1.2. Ensayo de fijación de la proteína marcada con radioactividad

Es un método alternativo para el análisis de folatos, basada en la competición entre los folatos de la muestra con folatos radiomarcados para los sitios de fijación en la proteína fijadora de folatos. La concentración de folato en la muestra corresponde a la relación entre la proteína unida y las especies libres de los folatos marcados. La aplicación al análisis de alimentos está limitada debido a los problemas con las variaciones en la afinidad de las proteínas de unión para las múltiples formas de folatos presentes en muchos alimentos (Shane y col., 1980; Stralsjöy col., 2002). Se ha observado una baja afinidad a las proteínas fijadoras de folatos (comparada con el ácido fólico) para el 5-HCO-THF (Gregory y col., 1982; Stralsjöy col., 2002), mientras que para el THF existe una mayor afinidad (Stralsjöy col., 2002) y para el 5MTHF se encuentra en el mismo rango que el ácido fólico a un pH de 9.3 (Givas y Gutcho, 1975; Stralsjöy col., 2002). Comparado con el MA, este método es menos tedioso, menos caro, menos tiempo consumido y está menos influenciado por la presencia de antibióticos o sustancias que pueden favorecer el crecimiento del *Lactobacillus casei* en el MA (Ball, 1998).

6.5.1.3. Método cromatográfico

Uno de los principales objetivos en este tipo de métodos es separar y cuantificar las diferentes formas de los folatos, que es importante debido al diferente grado de biodisponibilidad dependiendo de los sustituyentes de un carbono (Gregory y col., 1992). Sin este paso se pierde sensibilidad y selectividad en la detección de folatos. Para evitar este problema han sido diseñados diversos métodos de preparación de las muestras entre los que destacan los cartuchos de extracción rellenos de sílices modificados que han supuesto una alternativa a otros procedimientos tradicionales de preparación de muestras tales como el uso de resinas de intercambio iónico (Rebello, 1987; Vahteristo y Finglas, 2000). Los métodos de purificación más utilizados están basados en la afinidad cromatográfica de las muestras, de tal forma que incluyen el intercambio iónico fuerte a través de sílice u otras resinas donde los folatos son retenidos en relación a sus cargas y recogidos con tampones apropiados o soluciones de elución (Vahteristo y col., 1996). Para ello es precisa la preparación previa de las columnas de extracción o cartuchos (LiChrolut®).

La naturaleza hidrosoluble de los folatos, junto con las diferencias en las propiedades iónicas e hidrofóbicas, hacen que estos componentes se adapten perfectamente al intercambio iónico o fase-reversa del HPLC (Gregory, 1985). El análisis de folatos naturales se puede llevar a cabo por la hidrólisis de estos a monoglutamatos, o como poli-γ-

glutamilfolatos intactos. En la separación por fase reversa, la supresión o aumento de la ionización de los grupos funcionales por el pH, se puede usar efectivamente para regular la retención de folatos en la columna. El pH, la fuerza iónica y la polaridad del solvente se usan para optimizar la separación. La separación con pares iónicos se lleva a cabo en un pH neutro con surfactantes catiónicos usando el metanol y tetrabutilamoniofosfato (TBAP) (Reingold y Picciano, 1982; Holt y col., 1988; White y col., 1991; Gauch y col., 1993) o el gradiente de acetonitrilo con TBAP (Bagley y Selhub, 1997). Las formas monoglutámicas THF, 5-MTHF y 5-FTHF pueden ser detectadas tanto en el detector de fluorescencia como en ultravioleta. El ácido fólico (PGA) únicamente es visible en el rango de ultravioleta.

6.5.2. Pretratamiento de las muestras

El tratamiento de las muestras antes de su análisis puede ser dividido en tres estados diferentes: extracción, desconjugación y purificación de la muestra. Los folatos se extraen de la matriz del alimento, diluyendo la muestra en una solución tamponada con antioxidantes y empleando un tratamiento térmico. Estas soluciones tamponadas tienen un pH cercano a la neutralidad, son ligeramente ácidas o alcalinas, destacando el tampón acetato a pH 4.5-5, el tampón fosfato a pH 6-7 o el tampón CHES-HEPES a pH 7-8 (Eitenmiller y Landen, 1999). La estructura de la muestra es modificada por la homogeneización con las soluciones tampón. La homogeneización rompe las estructuras celulares y gracias al calentamiento los folatos son liberados dentro del tampón. El tratamiento por calor también provoca la desnaturalización de las proteínas de unión a los folatos y las enzimas que catalizan la interconversión de las distintas formas de folatos (Gregory, 1996; Ball, 1998). Los antioxidantes más utilizados son el ácido ascórbico y 2-mercaptoetanol, (MCE). El uso de estos dos antioxidantes unidos, ácido ascórbico al 2% y 2-MCE (0.2 M) a pH 7.85 ha sido ampliamente recomendado en la bibliografía (Wilson y Horne, 1984) puesto que permite superar los problemas de estabilidad del 10-FTHF y otras formas más lábiles. Algunos métodos no utilizan antioxidantes en la fase de extracción (Jacoby y Henry, 1992), pero si se quiere determinar el contenido total de folatos su utilización es esencial.

Las condiciones de pH también son muy importantes para preservar la estabilidad de los folatos frente a la oxidación (Gregory, 1989, 1996). Cada forma vitamínica derivada tiene su pH óptimo de estabilidad, lo que dificulta la optimización de unas condiciones de extracción que sean válidas para todas las formas de folatos. Otros factores que afectan la estabilidad de los folatos son la luz (Mastroaolo y Wilson, 1993), el pH del tampón extracción y el tipo de tampón (Gregory y col., 1990). Además, muchas formas derivadas pueden alterarse durante la extracción. Los fosfatos aceleran la conversión de unas formas en otras ya que el 10-HCO-THF se transforma en 5,10-CH⁺-THF y en 5-HCO-THF si la extracción transcurre a pH menores de 7.0; o bien el 5,10-CH₂-THF en THF (Schirch, 1997). Estos hechos

demuestran que las condiciones de extracción influyen en los resultados de la distribución de las formas derivadas por lo que las condiciones más adecuadas de extracción a menudo dependerán del objetivo del análisis. Por todo ello, la preparación de las muestras y los estándares se han de realizar en condiciones de reducida luminosidad (casi en oscuridad) y evitando el contacto con el aire (bajo atmósfera de nitrógeno).

La incorporación de enzimas como α -amilasa o proteasa durante la digestión permite una máxima cuantificación del contenido de folatos en alimentos, amiláceos (cereales) o proteicos (vísceras), cuando se utiliza previamente al análisis microbiológico o mediante radioinmunoensayo. Los investigadores que aplican el tratamiento trienzimático (conjugasa, amilasa y proteasa) destacan su esencialidad para la determinación óptima del contenido de folatos cuando hablamos de la dieta (Tamura y col., 1997). Sin embargo, cuando el método final de determinación de folatos es el cromatográfico (HPLC), el tratamiento trienzimático no es una práctica común, ya que para ello es necesario introducir un paso más en el proceso (Pfeiffer y col., 1997).

La mayor parte de los métodos de análisis precisan que los poliglutamatos presentes en los alimentos sean hidrolizados enzimáticamente a formas mono o di-glutamatos antes de poder ser cuantificados. Las fuentes más comunes de enzima pteroilglutamato hidrolasa (conjugasa) son las provenientes de páncreas de pollo (utilizada preferentemente en el método microbiológico), la proveniente de riñón de cerdo, y las de plasma humano o de rata (utilizados indistintamente) (Leichter y col., 1979).

6.6. Biodisponibilidad de folatos en la dieta

La biodisponibilidad de los folatos se define como la fracción de folatos ingeridos que son absorbidos en el intestino delgado y que pueden ser usados por los procesos metabólicos o almacenado en el cuerpo (Melse-Boonstra, 2003).

Existen estudios que demuestran que la biodisponibilidad de los folatos procedentes de una dieta mixta y variada es de alrededor de 50% mientras que la biodisponibilidad de formas monoglutámicas puede variar entre 70 y 120% en relación a la del ácido fólico (100%).

Los factores relacionados con la biodisponibilidad, bioconversión y bioeficacia de los folatos se pueden resumir en el acrónimo SLAMENGI, en inglés, cuyas iniciales corresponden a los siguientes factores: “Species” o forma química de folatos; “Linking” o uniones moleculares de los folatos; “Amount” o cantidad de folatos; Matriz alimentaria en la cual se encuentra; Efectos modificadores; estatus de Nutrientes en el organismo; factores

Genéticos; factores relacionados con el Hospedador; e Interacciones matemáticas (Melse-Bonstra, 2003).

- “Species” o forma química de folato. La biodisponibilidad, bioconversión y bioeficacia de las formas reducidas de folatos (5-MTHF, DHF, THF, 5-FTHF, 5,10-MTHF) pueden diferir de la forma oxidada (ácido fólico) (Gregory y col., 1992). La bioeficacia de la oxidación y reducción de los folatos con o sin varias unidades de carbono se ha investigado en varios estudios de intervención con personas. Este es el caso de Perry y Chanarin (1970), los cuales encontraron un aumento de folatos en suero después de la ingestión de folatos reducidos comparados con la ingesta de ácido fólico. Por el contrario, Tamura y Stokstad, (1973), Bhandari y Gregory, (1992), no han encontrado diferencias en la bioeficacia entre el ácido fólico y las formas reducidas de folatos.

Un problema que surge con la mayoría de las investigaciones acerca de la bioeficacia de los folatos es la elevada variación interindividual en la respuesta, siendo difícil averiguar si esas diferencias han sido causadas en la absorción (biodisponibilidad) o en procesos post-absorción (bioconversión).

- “Linking” o unión molecular. Los pteroilpoliglutamatos son la mayor forma de folatos presente en los alimentos, y tienen que sufrir una hidrólisis hasta monoglutamatos para poder ser absorbidos en el intestino delgado. La conjugasa presente en el yeyuno, es la responsable de la captación de moléculas glutamato de la pteroilpoliglutamato (Reisenauer y Halsted, 1987). Melse-Boonstra y col. (2004) indicaron que la biodisponibilidad de los poliglutamifolatos es más baja que los monoglutamifolatos. Aunque investigadores como Hannon-Fletcher y col. (2004) no encontraron evidencias que confirmen que la glutamación *per se* sea un factor limitante en la biodisponibilidad de los folatos endógenos en los alimentos.

- “Amount” o cantidad de folatos. La biodisponibilidad de los folatos probablemente esté influenciada por la cantidad de folatos ingerida. Para su absorción, existen dos sistemas de transporte diferentes. El primer transporte tiene lugar por las proteínas de unión a folatos, que se encuentran en la membrana, y el segundo es un mecanismo de transporte saturable. Sin embargo, en situaciones de altas concentraciones de folatos intraluminal ($>10 \mu\text{mol/L}$), el transporte de difusión juega un mayor papel en la absorción de estos folatos (Mason, 1990). El efecto de la cantidad ingerida parece jugar un papel importante si el sistema de transporte saturable se encuentra saturado. El transporte saturable de membrana puede alcanzar el grado de saturación con niveles normales de folatos endógenos en alimentos, aunque puede ser rápidamente alcanzado con folatos sintéticos, como el ácido fólico.

Además del papel que juegan la cantidad de folatos en la absorción, se ha observado que la respuesta relativa de la concentración de folato en suero y eritrocitos, a bajas dosis de ácido fólico (<200 µg/día), es más alta que a concentraciones mayores. Se ha comprobado que dosis superiores a 500 µg/día no dan lugar a mayores efectos en la disminución de las concentraciones de homocisteína. Muchos autores han investigado el efecto de diferentes concentraciones de ácido fólico sobre los niveles de homocisteína en plasma. En un meta-análisis (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 1998) se mostró un efecto de disminución similar en la homocisteína para dosis entre 0.5 y 5 mg de ácido fólico.

- Matriz alimentaria. La complejidad de la matriz del alimento o en general de la dieta afecta a la biodisponibilidad. Se ha comprobado que la biodisponibilidad de los folatos en una dieta variada es del 50% (Sauberlich y col., 1987). En el caso de dietas ricas en frutas y verduras, la biodisponibilidad varía en un rango mayor de entre 60 y 98% dependiendo de los parámetros medidos (Riddell y col., 2000).

- Efectos modificadores. La actividad de la pteroilglutamato hidrolasa es dependiente del pH (pH óptimo 6.5-7.0) y puede ser inhibida por tomate y zumo de naranja y también por citrato (Bhandari y Gregory, 1990). Se sabe que esta enzima necesita cinc para su actividad (Kauwell y col. 1995), por tanto, la biodisponibilidad de los poliglutamatos ingeridos dependerá de la cantidad de cinc presente en la dieta. Otros modificadores sería la fibra dietética que parece reducir la biodisponibilidad de los folatos, así como el alcohol que inhibe la absorción de los folatos en el intestino (Halsted, 1995).

- Estatus de nutrientes en el organismo. La deficiencia de folatos puede alterar el reparto de folatos entre los tejidos corporales, pero todavía no se ha aclarado si esto afecta a la bioeficacia de folatos (Varela-Moreiras y Selhub, 1992). Un déficit de vitamina B₁₂ afecta la bioconversión de folato en el organismo, ya que es necesaria esta vitamina para la correcta actividad de la metionina-sintetasa, que transfiere el grupo metil de la forma 5-MTHF hasta la homocisteína para formar metionina. La vitamina B₁₂ puede influir en la bioeficacia de los folatos, ya que su función se interrelaciona con la de los folatos. La metilcobalamina sirve como cofactor de la metionina sintetasa, enzima responsable de la remetilación de la homocisteína a metionina. En la misma reacción el 5-MTHF es desmetilado para dar THF (Savage y Lindenbaum, 1995). En la deficiencia de cobalamina, el 5-MTHF no puede convertirse en THF.

En un estudio *in vivo* realizado en ratas por Hong y col. (2000) se investigó el efecto de la deficiencia de cinc sobre la concentración de homocisteína en plasma y sobre la distribución de folatos en los hepatocitos. La conclusión a la que se llegó tras el estudio fue que tanto la disminución de la homocisteína en plasma como la disminución de la concentración de

folatos y del 5-MTHF en el hepatocito era secundaria al aumento de la actividad de metionina sintetasa durante estados de déficit de cinc.

- Factores genéticos. Una de las mutaciones genéticas relacionadas con el estatus de los folatos es la referente a la enzima metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Uno de los factores genéticos asociados a hiperhomocisteinemia es la mutación C677T en el gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Frosst y col., 1995). Esta mutación genera una variante termolábil de esta enzima implicada en el metabolismo de la homocisteína y produciendo así incremento de sus niveles en plasma. Este tipo de hiperhomocisteinemia aparece especialmente en conjunción con un déficit de folato. Este polimorfismo fue descrito inicialmente por Kang y col. (1991) como un factor de riesgo independiente de la enfermedad coronaria arterial. Se ha descrito que pacientes homocigotos para esta mutación presentan un incremento de riesgo a la trombosis venosa (Brattstrom y col., 1998).
- Factores relacionados con el hospedador. La edad no tiene influencia en la biodisponibilidad de folatos. Los requerimientos incrementan en la fase previa a la concepción y durante la gestación (Neuhouser y col., 1998), con fines preventivos frente a la enfermedad del tubo neural (Bower y col., 1993; Czeizel y Dudás, 1992). La biodisponibilidad se ve afectada negativamente en caso de desordenes del tracto gastrointestinal (Halsted, 1990). En los ancianos, al carecer de una dentadura adecuada, habitualmente no pueden tomar verduras frescas o alimentos crudos, y muchas veces la dieta se basa fundamentalmente en conservas enlatadas, baja en folatos y por tanto los requerimientos dietéticos diarios en folatos se ven incrementados con respecto a un adulto. En los niños, el déficit de folatos se observa con más frecuencia en los prematuros y tras dietas exclusivas basadas en leche de cabra, cuyo contenido en folatos es muy bajo, o la utilización de sustitutos lácteos sin suplementos vitamínicos (De Paz y Hernández-Navarro, 2005).

6.6.1. Métodos para la determinación de la biodisponibilidad de folatos

Actualmente, son muchos los estudios dedicados a la estimación y a la valoración de la biodisponibilidad del ácido fólico procedente de los alimentos de la dieta (Gregory, 1995). Los métodos de estimación de la biodisponibilidad pueden ser divididos en dos grupos: métodos *in vivo* y métodos *in vitro*. Muchos de ellos tienen limitaciones conceptuales, es decir los métodos *in vitro* pueden no predecir la biodisponibilidad *in vivo* de los folatos, mientras que, en el caso contrario, los métodos por isótopos pueden no predecir la biodisponibilidad de los folatos que están presentes de forma natural en los alimentos. Hasta ahora, la mayoría de los métodos han ofrecido información referente a la biodisponibilidad de los folatos totales en relación al ácido fólico más que sobre la biodisponibilidad absoluta

del total de folatos o de las diversas especies químicas de la vitamina. No obstante, estos son los métodos de los que se dispone y con los cuales se está trabajando actualmente.

6.6.1.1. Métodos in vivo

Estos métodos incluyen distintos bioensayos con animales, generalmente ratas y pollos, así como, protocolos a corto plazo y a largo plazo con dosis simple, métodos por isótopos y estudios de perfusión intestinal todos ellos realizados en humanos y animales (Gregory, 1988, 1989). Los estudios de perfusión intestinal han sido útiles en la determinación del ratio de absorción en ciertas condiciones, pero estos métodos han proporcionado también información que es aplicable para la predicción de la biodisponibilidad de las vitaminas en los alimentos (Rogers y col., 1997).

En el caso de los estudios realizados en humanos, es necesario autorización legal y aprobación de los protocolos que se vayan a seguir, deben ser estudios éticamente correctos, además de laboriosos y caros; suponen una selección previa de los individuos a estudiar. Por otro lado, los datos obtenidos en estos casos serán más exactos y fácilmente validables.

6.6.1.2. Métodos in vitro

El desarrollo de estos métodos intenta realizar la determinación de la biodisponibilidad de nutrientes permitiendo un mayor "screening" de muestras, más rápida y fácilmente que con los métodos *in vivo*. La ventaja de estos métodos es que son más económicos, menos laboriosos, se prescinde de los problemas éticos y de las limitaciones que conlleva trabajar con seres vivos. Se trata de simular los procesos enzimáticos que tienen lugar durante la digestión, de tal forma que se controlan las condiciones de pH, temperatura y tiempos de digestión, pero no se pueden controlar el resto de procesos fisiológicos que tienen lugar. La hipótesis inicial era que los componentes de los alimentos podían reducir la biodisponibilidad de los poliglutamatos por inhibición de la acción de la enzima localizada en el borde en cepillo de la mucosa intestinal (conjugasa). Existen estudios que demuestran que los inhibidores predominantes de la conjugasa son algunas especies aniónicas de ácidos orgánicos incluyendo citratos, malatos y ascorbatos donde todos ellos actúan como inhibidores competitivos (Wei y Gregory, 1998). La importancia de estos estudios es que predicen la incompleta biodisponibilidad potencial de los poliglutamilfolatos en alimentos, pero no predicen definitivamente la incompleta biodisponibilidad.

Seyoum y Selhub (1998) idearon una aproximación alternativa a la estimación *in vitro* de la biodisponibilidad de folatos. En este método un extracto de alimento conteniendo folatos naturales es incubado bajo condiciones diseñadas para simular el ácido gástrico, seguida de

una neutralización y una exposición a la actividad de la conjugasa intestinal. El “índice de biodisponibilidad” se calcula en base al concepto de retención *in vitro* (por ejemplo, referido a la estabilidad) y extensión de la hidrólisis de los folatos por acción de la conjugasa. Fue interesante el factor de correlación significativa obtenido entre el “índice de biodisponibilidad” *in vitro* y la biodisponibilidad aparente *in vivo* derivada de los estudios de Tamura y Stokstad (1973).

6.6.1.2.1. Modelo dinámico gastrointestinal in vitro TIM[®] (TNO In vitro Model)

Otro modelo de biodisponibilidad *in vitro* es el modelo TIM[®] (TNO In vitro Model). Es un sistema controlado por ordenador que determina el destino de los productos ingeridos en un medio cerrado simulando las condiciones gástricas e intestinales (Minekus y col., 1995). Durante la digestión de estos compuestos el modelo monitoriza y regula de forma continua los parámetros naturales tales como: temperatura corporal, pH, mezclado salivar, gástrico e intestinal y transporte por movimientos peristálticos, secreción gastrointestinal y absorción de agua y pequeñas moléculas tales como componentes liberados y digeridos. Sus ventajas son numerosas ya que permite obtener resultados seguros y reproducibles, no presenta limitaciones éticas, está validado, posee gran sensibilidad y es económico. Sin embargo, no permite la reproducción de la microflora intestinal así como la presencia de proteínas transportadoras. No obstante, se están desarrollando protocolos en los que se comienzan a incluir este tipo de enzimas y proteínas (Verwei y col., 2003). Como parte del proyecto europeo, “Folate: From Food to Functionality and Optimal Health” se obtuvieron diversas conclusiones acerca de la biodisponibilidad de los folatos mediante el modelo gastrointestinal in vitro TIM[®]. Un estudio llevado a cabo en tal proyecto fue la determinación de la biodisponibilidad de folatos procedentes de diversos productos líquidos y sólidos (Verwei y col., 2003). En el mismo, se concluyó que la biodisponibilidad de los folatos, durante el paso a través del modelo gastrointestinal in vitro TIM[®], en alimentos líquidos era un 10% menos accesible que aquellos presentes en las verduras de hoja verde.

7. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LAS VITAMINAS EN LA INFANCIA

Las vitaminas son cruciales para el desarrollo de una buena salud en los humanos; la ausencia de una cantidad suficiente de cualquiera de ellas puede causar serias enfermedades (Combs, 1992). La dieta humana no siempre contiene la cantidad de vitaminas necesarias para el desarrollo y mantenimiento normal de las funciones corporales. Por esta razón, ciertos productos alimenticios son suplementados con vitaminas, especialmente aquellos dirigidos a la nutrición infantil. Además, el procesado de los alimentos y los largos periodos de almacenamiento de los mismos pueden conducir a las pérdidas de las vitaminas. Por tanto, el enriquecimiento con las vitaminas permite que los requerimientos nutricionales de las fórmulas y otros alimentos infantiles sean alcanzados

(Zafra-Gómez y col., 2006). Las vitaminas son añadidas para anticipar y corregir las pérdidas que pueden ocurrir durante el procesado o almacenamiento de los alimentos. El enriquecimiento de los productos alimenticios con vitaminas generalmente se alcanza con premezclas que contienen elevadas concentraciones de vitaminas (Heudi y col., 2005).

En el 1^{er} informe sobre los requerimientos esenciales en las fórmulas infantiles y leches de continuación basadas en la composición mínima de proteínas de leche de vaca (SCF, 1983) se establecieron los requerimientos mínimos de las vitaminas hidrosolubles, pero no los niveles máximos. El nivel mínimo de cada vitamina es aquel que cuando es consumida en cantidades normales, asegurará que el recién nacido sea capaz de crecer y desarrollarse de manera normal y no será un riesgo de desarrollar un estatus nutricional inadecuado. La cantidad de un nutriente disponible de una fórmula sería adecuada para prevenir una deficiencia y al menos equivaldría a lo que normalmente está presente en la leche humana. En ausencia de planteamientos alternativos, generalmente el contenido de la mayoría de las vitaminas hidrosolubles en la leche humana ha sido usado para hacer una valoración de las necesidades del lactante, basándose en la ingesta del mismo alimentado con leche materna de madres sanas y con un estatus nutricional adecuado. Para las fórmulas infantiles, una diferencia debe ser establecida entre la presencia natural de un nutriente y lo que se añade bien por razones tecnológicas o para tener en cuenta las pérdidas provocadas durante la vida comercial del mismo. Sin embargo, una vez que la ración adecuada ha sido desarrollada para asegurar que los requerimientos normales han sido establecidos, un razonable margen de seguridad, basado generalmente en la cantidad presente, no se esperaría requerir de una ingesta en exceso de 2 a 5 veces lo requerido, a menos que haya una clara evidencia para justificar una alternativa (Miller, 1989). Una recomendación se hizo para el mínimo nivel en las fórmulas infantiles y un máximo nivel expresado en g/100 Kcal (g/100 Kj). Los datos propuestos están basados en un niño de corta edad de 5 Kg, con una ingesta energética de 500 Kcal/d, que equivale un volumen de ingesta de 750 mL/d de una fórmula que contiene 67 Kcal/mL (Thompkinson y Kharb., 2007).

Los procesados industriales empleados en la producción de fórmulas y leches infantiles pueden afectar a los niveles de nutrientes en el producto final. Cuando la leche es desmineralizada (por ultrafiltración, intercambio iónico o electrodiálisis), hay pérdidas inevitables de nutrientes y especialmente vitaminas hidrosolubles y liposolubles, aminoácidos y péptidos pequeños. Además, en la leche desnatada se pierde vitaminas liposolubles (Ros y col., 1993). Para compensar estas pérdidas de fabricación y modificar la composición del producto para los requerimientos del recién nacido o niño de corta edad, las vitaminas son añadidas al final del proceso de producción. Aunque, las leches de los lactantes o niños de corta edad están diseñados a partir de la leche materna, su contenido

en vitaminas generalmente son más elevadas como medida de prevención. Además, estas leches generalmente no son consumidas inmediatamente después de su fabricación, y las vitaminas pueden estar afectadas por varios factores tales como el tipo de empaquetamiento y el tiempo y las condiciones de almacenamiento (exposición al oxígeno, luz e incremento de la temperatura) (Albalá-Hurtado y col., 2000a). Las pérdidas varían con las vitaminas. La tiamina es especialmente sensible al calor, mientras que el ácido fólico, vitamina B₆ y riboflavina son fotosensibles y la vitamina A es sensible a la luz, oxígeno y ácidos (Tannenbaum y col., 1993). Las pérdidas dependen tanto de la naturaleza de las vitaminas como de los otros compuestos presentes en la matriz del alimento; por ejemplo, el ácido fólico está protegido contra la oxidación por la oxidación de la vitamina C (Scott y col., 1984).

7.1. Vitaminas hidrosolubles

7.1.1. Tiamina o Vitamina B1

La tiamina es un compuesto soluble en agua formado por un núcleo de pirimidina y tiazol unidos por un enlace metileno. Es estable al calor, pero se destruye rápidamente a pH < 5.5. Está disponible como mononitrato e hidroclorehídrico. En su forma activa de coenzima, la tiamina pirofosfato interviene como parte integral en el metabolismo de los carbohidratos, específicamente en el descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos y piruvato y también participa en la vía de las pentosas (Thompkinson y Kharb., 2007).

El contenido de tiamina durante la lactación temprana está en torno a los 20-133 $\mu\text{g/L}$ (3-20 $\mu\text{g}/100$ Kcal) (Nail y col., 1980; Dostalova y col., 1988) y para la leche madura es de 200 $\mu\text{g/L}$ (30 $\mu\text{g}/100$ Kcal) (Picciano, 1995). El comité sobre la nutrición de la Academia Americana de Pediatría estableció las siguientes recomendaciones (mínimo de 60 $\mu\text{g}/100$ Kcal y un máximo de 300 $\mu\text{g}/100$ Kcal) en el contenido de tiamina en fórmulas infantiles y de continuación (AAP, 1999) que coinciden con los niveles establecidos en la Directiva 2006/141/CE.

7.1.2. Riboflavina o Vitamina B2

La riboflavina es una vitamina hidrosoluble que funciona como un componente de 2 coenzimas: flavin mononucleotido (FMN) y flavin adenina dinucleotido (FAD). Es estable cuando se deseca pero se deteriora rápidamente en soluciones alcalinas, siendo acelerado por la luz. Se pierde con el agua de cocinado y con la pasteurización las pérdidas pueden llegar a ser del 20%. Se absorbe rápidamente por el intestino delgado a través de un mecanismo de transporte en el que está implicado la fosforilación para dar FMN. Picciano (1995) sugirió que los valores típicos de la leche materna estaban alrededor de los 400-600 $\mu\text{g/L}$ (60-90 $\mu\text{g}/100$ Kcal). En 1989 la RDA para la riboflavina fue establecida en 400 μg para lactantes hasta los 6 meses de edad (80 $\mu\text{g}/100$ Kcal). Basándose en esto el contenido

mínimo recomendado en fórmulas infantiles es de 80 µg/100 Kcal, con un nivel máximo de 400 µg/100 Kcal (SCF, 2003). La Directiva 2006/141/CE establece que los niveles de riboflavina de las fórmulas infantiles y de continuación deben variar entre 80 y 400 µg/100 Kcal.

7.1.3. Niacina o Vitamina B3

La niacina es la forma genérica para el ácido nicotínico (ácido carboxílico 3-piridina), nicotimamida (amida ácido nicotínico), y las coenzimas de la vitamina (NAD y NADP). Los nucleótidos de la piridina activa las dehidrogenasas y son esenciales para el transporte de electrones y otras reacciones de la respiración celular). La niacina es estable en los alimentos y no se destruye por calor o un almacenamiento prolongado. Los humanos son capaces de sintetizar la niacina a partir del triptófano; por lo tanto, el contenido de niacina en los alimentos se expresa como equivalentes de niacina. La concentración de niacina en la leche humana es mucho mayor que en la leche de vaca (Thompkinson y Kharb., 2007).

Dentro de la Unión Europea, la directiva de fórmulas infantiles y de continuación específica que el contenido mínimo de niacina en ambos tipos de productos oscile entre 300 µg/100 Kcal y 1500 µg/100 Kcal (Directiva 2006/141/CE).

7.1.4. Ácido Pantoténico o Vitamina B5

El ácido pantoténico es formado por el ácido pantoico y la β-alanina. Es un componente biológico de la coenzima A. Es una vitamina soluble en agua, estable en soluciones neutras, pero inestable en soluciones ácidas, básicas y al calor. Los suplementos de ácido pantoténico están disponibles como la sal cálcica o alcohol, el cual es más estable, muy soluble en agua, y rápidamente convertible a la forma de ácido libre en el organismo. Es esencial para el funcionamiento de la coenzima A y en la mayoría del transporte a los tejidos. La excreción urinaria está muy relacionada con la ingesta en la dieta. En la leche humana el ácido pantoténico presenta una concentración de 6,7 mg/l (1 mg/100 Kcal) (Johnston y col., 1981), 1,9 mg/l (284 µg/100 Kcal) (Song y col., 1984), 2-2,5 mg/l (269-552 µg/100 Kcal) (Picciano, 1995), y 0,48-2,45 mg/l (269-552 µg/100 Kcal) (Plesofsky-Vig, 1996). Estas diferencias han sido atribuidas a la variación dietética maternal o a métodos analíticos Thompkinson y Kharb., 2007).

Las recomendaciones para el ácido pantoténico, según el comité de la Asociación Americana de Pediatría en las fórmulas infantiles y de continuación, fueron de un mínimo de 400 µg/100 Kcal, y un máximo de 2000 µg/100 Kcal (SCF, 2003).

7.1.5. Piridoxina o Vitamina B6

La piridoxina engloba a un grupo de compuestos químicamente relacionados, en los que se incluye la piridoxamina y el piridoxal, los cuales se encuentran en los productos animales, y la piridoxina, que se encuentra en las plantas. Todas las formas son tomadas por el intestino delgado y convertido a fosfatos de piridoxal en los tejidos. La piridoxina requiere riboflavina, cinc, y magnesio para su normal funcionamiento. Los requerimientos dietéticos para la piridoxina varían en relación al consumo dietético de proteínas (Hansen y col., 1996). El contenido de piridoxina en la leche aumenta a medida que la ingesta materna de la vitamina aumenta, estando correlacionado con el estatus de la misma en el organismo, estando afectado por el estado de la lactación, tiempo de gestación y el uso de anticonceptivos orales. El contenido de piridoxina en la leche materna aumenta durante el curso de la lactación (LSRO, 1998). La concentración de la leche materna madura puede variar desde 70-310 µg/L (10.4-46.3 µg/100 Kcal). Una fórmula que proporciona 5.56 µg piridoxina/g de proteína fue suficiente para prevenir convulsiones en la mayoría de los lactantes, mientras que una concentración de 4.13 µg/g de proteína no fue suficiente en la prevención de los síntomas de la deficiencia en todos los lactantes (Borschel, 1995).

El comité de la Asociación Americana de Pediatría estableció las siguientes recomendaciones en el contenido de piridoxina en fórmulas infantiles y de continuación: contenido mínimo de 35 µg/100 Kcal, y un máximo de 165 µg/100 Kcal (SCF, 2003). La deficiencia de vitamina B₆, aunque es poco común, puede alterar la síntesis del grupo hemo y dar lugar a una anemia normocítica, microcítica o sideroblástica. El tratamiento de la anemia sideroblástica con vitamina B₆ restablece la actividad del ácido δ-aminolevulínico sintetasa (ALAS), la enzima limitante en la síntesis del grupo hemo, corrigiendo las anomalías hematológicas (Ofori-Nkansah y col., 1975; Meier y col., 1981). La vitamina B₆ puede además inhibir la formación de los eritrocitos en forma de hoz presentes en la anemia falciforme (Natta y Reynolds., 1984).

Dentro de la Unión Europea, la directiva de fórmulas infantiles y de continuación especifica que el contenido mínimo de vitamina B₆ en estos productos oscile entre 35 µg/100 Kcal y 175 µg/100 Kcal (Directiva 2006/141/CE).

7.1.6. Cobalamina o Vitamina B12

La Cobalamina es una vitamina hidrosoluble y miembro de una familia de moléculas relacionadas conocidas como corrinoideas, las cuales contienen un núcleo de corrina formado por un anillo tetrapirrólico. El centro del centro del anillo tetrapirrólico contiene un ión cobalto que puede ser atacado por un grupo metilo, deoxiadenosil, hidroxilo o ciano. El calentamiento de los alimentos provoca la pérdida de la actividad de la cobalamina entre un 10-90%. La cobalamina se almacena en el hígado y al nacer el hígado de un recién nacido a

término contiene un 25-30 µg de esta vitamina, con un contenido total en el cuerpo de 30-40 µg (Thompson y Kharb., 2007).

La deficiencia de cobalamina es rara en lactantes, aunque puede ocurrir por una deficiencia congénita del factor intrínseco, o como resultado de una ingesta inadecuada de la leche humana de madres que consumen una dieta estrictamente vegetariana. Dentro de la Unión Europea, la directiva 2006/141/CE especifica que el contenido mínimo de cobalamina de una fórmula infantil y de continuación sería de 0.1 µg/100 Kcal con un máximo de 0.5 µg/100 Kcal.

Una segunda causa nutricional de anemia megaloblástica es la deficiencia de vitamina B₁₂ (cobalamina), que puede producir anemia macrocítica y un fallo neurológico severo. La vitamina B₁₂ es un cofactor esencial en al menos dos reacciones de transmetilación, una de las cuales se encuentra interrelacionada con el ácido fólico en la síntesis del ADN y la hematopoyesis. La conversión de la homocisteína a metionina requiere una enzima dependiente de la vitamina B₁₂ así como de un grupo metil donado por el 5-metiltetrahidrofólico (5-metilTHF). Con una deficiencia en la vitamina B₁₂ la función de la enzima es interrumpida, la formación de la metionina se altera, y tanto el 5-metilTHF como la homocisteína se acumulan (Fishman y col., 2000).

La deficiencia de la vitamina B₁₂ ocurre con menos frecuencia que la deficiencia de ácido fólico, debido a que tiene lugar como resultado de un defecto en la absorción más que de una ingesta insuficiente (Herbert, 1984). Las reservas corporales de vitamina B₁₂ entre adultos sanos y normales son cuantiosas y se necesitarían unos 3-4 años para agotarla consumiendo una dieta sin vitamina B₁₂ o quizás unos 20 años con una dieta baja en vitamina B₁₂, esto se debe a la existencia de una eficaz circulación enterohepática que recicla la vitamina B₁₂ desde la bilis a otras secreciones intestinales (Antony, 1991). Sin embargo, varios estudios han observado que las mujeres embarazadas que son vegetarianas estrictas o consumen pequeñas cantidades de productos cárnicos presentan un elevado riesgo de llegar a ser deficientes en vitamina B₁₂ durante el embarazo y la lactación (Allen y col., 1992; Allen, 1994).

En general, el tratamiento de la anemia megaloblástica con ácido fólico sólo puede enmascarar la deficiencia de la vitamina B₁₂, la cual puede conducir a severas secuelas neurológicas. Por la tanto, esta enfermedad debería ser tratada tanto con ácido fólico como con vitamina B₁₂. Diversos estudios han sugerido que la suplementación con la vitamina B₁₂:

1. No tiene ningún efecto sobre la concentración de la hemoglobina en mujeres embarazadas.

2. Puede aumentar los niveles de hemoglobina y reducir la severidad de la anemia en los niños prematuros y con bajo peso al nacer.

7.1.7. Ácido Ascórbico o Vitamina C

El ácido L-ascórbico es un compuesto de 6 carbonos relacionado estructuralmente con la glucosa. Es un agente con una elevada capacidad reductora, tanto el ácido ascórbico como su forma oxidada (ácido L-dehidroascórbico) presentan actividad biológica y son interconvertibles por una reacción de oxidación/reducción. En la mayoría de los tejidos el ácido ascórbico existe en la forma reducida (90%) (Thompkinson y Kharb., 2007).

Bates y Prentice (1994) estimaron que el contenido medio del ácido L-ascórbico de la leche humana era de 55 mg/L. El comité de la Asociación Americana de Pediatría estableció que el contenido mínimo del ácido ascórbico en las fórmulas infantiles y de continuación sería de 10 mg/100 Kcal y un máximo de 30 mg/100 Kcal (AAP, 1999).

La deficiencia de vitamina C se asocia con varias formas de anemia, pero no está claro si esta vitamina (ascorbato) está directamente implicada en la hematopoyesis o si la anemia aumenta indirectamente las interacciones de la vitamina C con el ácido fólico y el metabolismo del hierro (Oski, 1995). En su papel como agente reductor, la vitamina C puede facilitar la absorción del hierro desde el tracto gastrointestinal y permitir su movilización desde las reservas. El hierro y el ácido ascórbico forman un complejo quelante-hierro que es más soluble en el medio alcalino del intestino delgado y, por lo tanto, más fácil es su absorción (Bothwell y col., 1964; Lynch y Cook, 1980; Hallberg y col., 1987; Clark y col., 1992). La suplementación con vitamina C puede aumentar la absorción del hierro de la dieta. Sin embargo, el ácido ascórbico debe ser consumido casi a la misma vez que el hierro para ser eficaz (Cook y Monsen, 1977). Además, la vitamina C puede contrarrestar la inhibición de la absorción del hierro producida por los fitatos y taninos de la dieta (Hallberg y col., 1987).

El ácido ascórbico puede, al mismo tiempo, activar la enzima ácido fólico reductasa, para formar el ácido tetrahidrofólico, la forma activa del ácido fólico que previene la anemia megaloblástica (Oski, 1995; Stokes y col., 1975). También puede prevenir la pérdida de hierro debido a hemorragias asociadas con la deficiencia en vitamina C, y posiblemente, previene la hemólisis resultante de los mecanismos de defensa antioxidante de las células (Oski, 1995; Chow, 1979).

En general, la vitamina C mejora la absorción del hierro no hemo, protege a las células frente al daño oxidativo y contrarresta los efectos de los inhibidores de la absorción del

hierro. También, incrementa los niveles de hierro en suero, las concentraciones de ferritina y hemoglobina en los niños y mujeres no embarazadas (Fishman y col., 2000).

Dentro de la Unión Europea, la directiva de fórmulas infantiles y de continuación específica que el contenido mínimo de vitamina C en ambos productos oscile entre 10 $\mu\text{g}/100$ Kcal y 30 $\mu\text{g}/100$ Kcal (Directiva 2006/141/CE).

7.1.8. Vitamina B8 o Biotina

La Biotina es una vitamina hidrosoluble con una estructura de anillo bicíclico, y en uno de ellos un átomo de azufre. La biotina es absorbida directamente por un transportador altamente específico y por transportadores de péptidos no específicos. Es sintetizado por la microflora del cólon y probablemente absorbida. En la leche humana, la biotina está presente en su forma libre. El contenido medio es de 6 $\mu\text{g}/\text{l}$ (24 nmol/l) en un rango de 5-9 $\mu\text{g}/\text{l}$ (0,75-1,3 $\mu\text{g}/100$ Kcal) (Salmenpera y col., 1985; Hirano y col., 1992; Bates y Prentice, 1994; Picciano, 1995). En los niños de 0 a 6 meses de edad, el consumo medio es alrededor de 5 $\mu\text{g}/\text{d}$. No se han observado evidencias de una deficiencia dietética de biotina en recién nacidos alimentados con leche materna o niños de corta edad alimentados con formulas con un contenido de 5-9 $\mu\text{g}/\text{l}$. Dentro de la Directiva de las fórmulas infantiles de la Unión Europea específica que el contenido mínimo de biotina en las fórmulas infantiles sería 1,5 $\mu\text{g}/100$ Kcal, mientras que el contenido máximo sería de 7,5 $\mu\text{g}/100$ Kcal (Directiva 2006/141/CE).

7.2. Vitaminas liposolubles

Las vitaminas A, E, D y K son solubles en la grasa, por lo tanto su absorción está relacionada con la eficacia de la absorción de la grasa. Las vitaminas liposolubles son almacenadas en los tejidos adiposos, y elevadas ingestas durante largos periodos de tiempo pueden conducir a su acumulación en los tejidos (Thompson y Kharb, 2007).

7.2.1. Vitamina A

La vitamina A son un grupo de sustancias sintéticas y naturales con actividad de todas las trans-retinol. Las fuentes de retinol usadas en las formulas infantiles y de continuación son el retinol, palmitato de retinol y acetato de retinol (Directiva 2006/141/CEE). El valor biológico de las sustancias con actividad de vitamina A es expresado como equivalente de retinol (ER), donde 1 ER es igual a 1 μg de retinol trans. La vitamina A modula el crecimiento y diferenciación de las células del epitelio y del hueso, es requerido para la reproducción, síntesis de testosterona, y en la integridad de varias funciones inmunes (SCF, 1993; Dawson, 2000; Stephensen, 2001; Clagett-Dame y De Luca, 2002). Los rangos fijados de

retinol preformado o ésteres de retinol en formulas infantiles y formulas de continuación están reflejados en la Tabla 3.

7.2.2. Vitamina D

El término vitamina D hace referencia a un grupo de sustancias con actividad antirraquíticas. La vitamina D₃ (coleciferol) es de origen animal y puede ser tanto suministrada por la dieta como ser sintetizada de manera endógena a partir de la 7-dehidrocolesterol o provitamina D₃ en la piel mediante la exposición a la luz ultravioleta (SF, 1993; Bässler y col., 2002). La vitamina D₂ (ergocalciferol) es de origen vegetal. La vitamina D es hidroxilada principalmente en el hígado a 25-hidroxi-vitamina D₃, la cual es liberada a la circulación. En el riñón, la 25-OH-Vitamina D es hidroxilada a 1,25-dihidroxi-vitamina D, que es la forma biológicamente más activa de la vitamina D y responsable de la mayoría de los efectos de la vitamina D, particularmente en el metabolismo del calcio. La principal función de la 1,25-dihidroxi-vitamina D es incrementar la absorción del calcio y fósforo. Además, estimula la reabsorción tubular del calcio y fósforo en el riñón. En general, la vitamina D es importante durante la fase de rápido crecimiento y mineralización del hueso que tienen lugar durante la infancia (Csaszar y Abel, 2001).

Actualmente, la administración de vitamina D durante la infancia con formula infantil y formula de continuación en Europa es del orden de 7-20 µg vitamina D₃/día o 280-800 IU/día. Además del suministro a través de la leche humana, los niños de corta edad son a menudo suplementados con vitamina D₃ como medida adicional para la prevención del raquitismo, en una dosis diaria de 10-12.5 µg vitamina D₃/día o 400-500 IU/día (Thompson y Kharb, 2007).

Dentro de la Unión Europea, la directiva de fórmulas infantiles y de continuación especifica que el contenido mínimo de vitamina D en fórmulas infantiles en forma de coleciferol oscile entre 1 µg/100 Kcal y 2.5 µg/100 Kcal mientras que para fórmulas de continuación las concentraciones deben situarse entre 1 y µg/100 Kcal; en ambos casos en forma de coleciferol, del que 10 µg = 400 i.u. de vitamina D. (Directiva 2006/141/CE).

7.2.3. Vitamina E

La vitamina E engloba a todos los derivados sintéticos y naturales del tocol y tocotrienol que tienen la actividad biológica de RRR-α-tocoferol (1 mg RRR-α-tocoferol = 1 mg equivalente α-tocoferol, α-ET; actividad del 100%), que difiere en la posición de los grupos metilo en sus cadenas laterales. La vitamina E actúa como un antioxidante en los tejidos y es considerada esencial para la protección de los lípidos insaturados en las membranas biológicas frente al daño oxidativo (Traber y Sies, 1996). La vitamina E es absorbida en el

intestino delgado después de entrar en una mezcla micelar, que requiere la presencia de los ácidos biliares y enzimas pancreáticas para formar monoglicéridos que son incorporados en las micelas. Anterior a la absorción, los ésteres de vitamina E necesitan ser hidrolizados por la acción de las sales biliares y la lipasa estimulada presente en la leche humana o por actividad lipolítica pancreática (Hernell y Blackberg, 1994). La absorción de la vitamina E parece ser un proceso pasivo y no saturable sin ningún transportador específico (Thompkinson y Kharb, 2007). Según la Directiva 2006/141/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación, recomienda que el contenido mínimo de vitamina E sería de 0.5 mg α -ET/g ácidos grasos poliinsaturados expresados como ácido linoleico, corregido en función de los dobles enlaces, es decir, 0,5 mg de α -ET/1 g de ácido linoleico (18:2n-6); 0,75 mg de α -ET/1 g de α -ácido linolénico (18:3 n-3); 1,0 mg de α -ET/1 g de ácido araquidónico (20:4 n-6); 1,25 mg de α -ET/1 g de ácido eicosapentanoico (20:5 n-3); 1,5 mg de α -ET/1 g de ácido docosahexanoico (22:6 n-3), pero en ningún caso inferior a 0.5 mg/100 Kcal.

7.2.4. Vitamina K

La leche humana contiene bajas concentraciones de vitamina K proporcionada principalmente por la filoquinona. Hay una conformidad general que la cantidad de vitamina K suministrada por la leche humana no es suficiente para alcanzar los requerimientos de todos los recién nacidos. Por tanto, la suplementación de la vitamina K además del suministro a través de la leche de pecho generalmente es recomendada en la infancia temprana. En el recién nacido a término y niños de corta edad, la deficiencia de vitamina K puede inducir una severa coagulopatía con enfermedad hemorrágica o desangrado intracraneal (Thompkinson y Kharb, 2007). Los niveles de vitamina K en las fórmulas infantiles y de continuación, generalmente por encima de los 4 μ g/100 Kcal, proporcionan una eficaz protección frente a la deficiencia de la vitamina K y la existencia de desangrado y puede proporcionar un cierto nivel de seguridad e incluso bajo ciertas condiciones de incompleta absorción de la vitamina (Suzuki y col., 2001). Se ha observado que la administración diaria de 25 μ g de vitamina K₂ (menaquinona) en niños de corta edad en Holanda (Cornelisse y col., 1997) y la suplementación oral en recién nacidos, durante las primeras semanas de vida en diferentes países, con varios mg de vitamina K no mostró ningún efecto adverso. Actualmente las formulas infantiles y de continuación contiene 4-25 μ g/100 Kcal.

8. PREDICCIÓN DE LA PÉRDIDA DE VITAMINAS. MODELO CINÉTICO-MATEMÁTICO

Las vitaminas son inestables en los alimentos. Las condiciones en el procesado y cocinado causan pérdidas de vitaminas. Las pérdidas pueden variar según el método de cocinado y el tipo de alimento. La degradación de las vitaminas dependen de parámetros

específicos durante los procesos culinarios, es decir, la temperatura, oxígeno, luz, humedad, pH y obviamente la duración del tratamiento térmico (Lešková y col., 2006).

El deterioro de los alimentos se debe a un conjunto de procesos químicos, físicos o microbiológicos que afectan a una serie de características del alimento. La evaluación de la vida útil puede hacerse mediante el estudio de la evolución de algunos parámetros seleccionados durante un periodo de tiempo (Singh, 1994) de modo que consideraremos que el estado del alimento viene determinado por el deterioro que ha sufrido. El conocimiento de las reglas que determinan estos cambios es una herramienta necesaria para desarrollar el modelo que se va a utilizar en los experimentos de vida útil.

El uso de un enfoque químico cinético para definir modelos de cambios en la calidad de los alimentos fue sugerido por Kwolek y Bookwalter en 1971. Tomando un enfoque general, Ferrer (1986) propone la siguiente ecuación para describir la pérdida de calidad en un alimento:

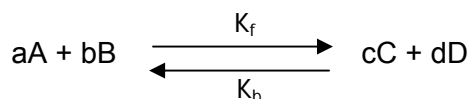
$$-dc/dt = f(E_i, F_j)$$

donde: $-dc/dt$ es la velocidad de deterioro, E_i son los factores ambientales ($i = 1, 2, \dots, n$), y F_j son los factores de composición ($j = 1, 2, \dots, m$).

Los efectos de algunos de estos factores se pueden expresar con relativa facilidad mediante una relación funcional, que es similar en muchas reacciones de deterioro; otros, son más complicados y únicos en su comportamiento y deben estudiarse por separado para cada producto y sistema alimenticio. Se denominan *factores intrínsecos* los que están determinados por la composición química y las propiedades biológicas y físicas del alimento. Estos factores son: el pH, la actividad de agua, el potencial de óxido-reducción, el contenido de oxígeno, los agentes microbianos y el contenido en nutrientes. En ellos influyen los tratamientos tecnológicos, que pueden ser de tipo físico o químico. Como *factores extrínsecos*, se conoce al conjunto de características propias del medio ambiente en donde se almacena o conserva el alimento, tales como temperatura, humedad ambiental y presión parcial de oxígeno.

Para describir los modelos que siguen los procesos de deterioro de los alimentos es necesario revisar algunos conceptos relacionados con la cinética de las reacciones químicas (Singh, 1994).

La cinética química se ocupa del estudio de la velocidad y los mecanismos por los cuales una especie química se convierte en otra. De forma general, podemos considerar una reacción química como lo siguiente:



En esta expresión, A y B son los reactivos, C y D , los productos y a , b , c y d los coeficientes estequiométricos de reactivos y productos. k_f y k_b son las constantes de velocidad de la reacción en un sentido y otro. La velocidad a la cual reacciona la especie A se representa por la siguiente expresión:

$$-d[A]/dt = K_f [A]^a [B]^b - K_b [C]^c [D]^d$$

donde $[A]$, $[B]$, $[C]$ y $[D]$ son las concentraciones de reactivos y productos, a, b, c y d son los órdenes de reacción respecto de cada reactivo o producto y t es el tiempo.

Estas ecuaciones generales no se pueden resolver porque existen muchos datos desconocidos y se recurre, por ello, a simplificaciones. Por ejemplo, se puede considerar que la reacción se desarrolla prácticamente en un sólo sentido, hacia la formación de C y D , con lo cual k_b es despreciable frente a K_f . Si consideramos que la concentración del reactivo B se mantiene muy alta, podemos admitir que el cambio es prácticamente nulo y por lo tanto $[B]$ permanecería constante. Estas consideraciones llevan a la siguiente expresión:

$$-d[A]/dt = K'_f [A]^n$$

donde k'_f es la pseudo-constante de velocidad para la variación de $[A]$ y n es el orden de reacción. Esta expresión muestra cómo la velocidad de una reacción química se relaciona con la concentración inicial de la especie de que se trate y de su orden de reacción: una leve modificación de esta expresión nos permite construir una expresión fundamental en el planteamiento de estudios de vida útil de alimentos. Si escribimos la expresión anterior refiriéndonos a un atributo de calidad (Q) obtenemos la siguiente expresión:

$$\pm dQ/dt = KQ^n$$

En esta expresión, el símbolo \pm nos indica que el parámetro de calidad seleccionado puede incrementarse o disminuir con el tiempo, k sigue siendo la pseudo-constante de velocidad y n el orden de reacción.

Esta expresión puede utilizarse para estudiar la variación con el tiempo de un parámetro de calidad determinado, suponiendo que se conoce el orden de reacción del proceso, y es la base para desarrollar un modelo predictivo.

El desarrollo de esta expresión, considerando diferentes órdenes de reacción, podría llevar a una serie de ecuaciones. Sin embargo, vamos a desarrollar los órdenes “cero” y “uno” que son los que se producen en la mayoría de procesos relacionados con la evaluación de la vida útil de alimentos (Labuza, 1982, Singh, 1994).

8.1. Reacción de “orden cero” en la cinética de deterioro de los alimentos

Si la reacción es de “orden cero”, y suponemos que se trata de un parámetro de calidad Q cuya magnitud desciende con el tiempo, la expresión queda de la siguiente forma:

$$-dQ/dt = K$$

La integración de esta expresión nos da la siguiente ecuación: $Q = Q_0 - Kt$

donde Q_0 es el valor del parámetro Q a tiempo cero, o sea el valor inicial, y Q es el valor del parámetro a tiempo t . La evolución del parámetro Q es lineal con el tiempo: es lo que Labuza (1982) define como “pérdida constante de vida útil”. Si se puede definir un valor del parámetro Q , Q_f , que determine que el producto ha llegado al final de su vida útil, entonces, se podrá calcular el tiempo de vida útil del producto, t_v , con la siguiente expresión:

$$t_v = (Q_0 - Q_f) / K$$

La cinética de “orden cero” es útil para describir reacciones como la degradación enzimática, el pardeamiento no enzimático y la oxidación lipídica (Labuza, 1982; Singh, 1994).

8.2. Reacción de “orden uno” en la cinética de deterioro de los alimentos

Haciendo la misma consideración anterior, y suponiendo que la reacción es de “orden uno”, la expresión queda de la siguiente forma:

$$-dQ/dt = KQ$$

Integrando esta expresión, llegamos a la siguiente fórmula:

$$\ln(Q/Q_0) = -Kt$$

Si despejamos Q , nos queda:

$$Q = Q_0 \exp(-Kt)$$

La representación gráfica de esta fórmula lleva a una curva: es lo que Labuza (1982) define como “pérdida variable de vida útil”. La velocidad de cambio no es constante durante el proceso y está relacionada con la magnitud del parámetro de calidad Q en el momento en que se considere.

Al igual que en el caso anterior, podemos calcular el tiempo necesario, t_v , para alcanzar un nivel del parámetro Q que consideremos rechazable y que llamaremos Q_f . Este tiempo determinará la vida útil del producto:

$$t_v = \ln(Q_0/Q_f)/K$$

Entre los procesos relacionados con la vida útil de los alimentos que siguen cinéticas de orden uno tenemos las pérdidas vitamínicas, el crecimiento y destrucción microbiana y la pérdida de calidad de proteínas en los alimentos deshidratados (Labuza, 1982).

8.3. Efecto de la temperatura

En las consideraciones del apartado anterior no se ha mencionado la temperatura. Las expresiones que se han obtenido son válidas para una temperatura establecida que se mantenga fija durante el periodo de estudio, aunque lo normal es que durante el almacenamiento se produzcan fluctuaciones de temperatura. Estas variaciones influyen de manera importante en la velocidad de las reacciones químicas y, por lo tanto, se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar un modelo. La temperatura será, además, un factor fundamental para planificar estudios de vida útil, por su efecto acelerador, que puede explicarse mediante la ecuación de Arrhenius.

8.3.1. La ecuación de Arrhenius

La ecuación de Arrhenius expresa la influencia de la temperatura en la velocidad de reacción en los estudios de vida útil de los alimentos (Labuza, 1982). Si se tiene en cuenta esta ecuación, junto con las expresiones cinéticas de los distintos órdenes de reacción, se puede construir un modelo cinético-matemático que describa el deterioro de un alimento durante su almacenamiento, teniendo en cuenta la influencia que ejerce la temperatura sobre los distintos procesos de deterioro (Saguy y Karel, 1980). El desarrollo de estos modelos permite la obtención de energías de activación de procesos concretos de deterioro a partir de valores experimentales de parámetros indicadores de estos procesos. Estos datos permiten la estimación de los tiempos de vida útil a diferentes temperaturas de almacenamiento (Lai y Heldman, 1982).

La expresión de Arrhenius tiene en cuenta todos estos elementos y muestra cómo el parámetro k de la ecuación de velocidad de reacción varía con respecto de la temperatura (Labuza, 1982) según la expresión:

$$K = K_0 \exp(-Ea/RT)$$

donde, k_0 es la constante pre-exponencial, Ea es la energía de activación del proceso (expresada en calorías/mol), R es la constante general de los gases (1,986 calorías/mol °K) y, finalmente, T es la temperatura expresada en °K (°C+273). A partir de esta expresión se puede obtener, por sustitución del valor k , ecuaciones de "orden cero" y de "orden uno":

"Orden cero":
$$Q = Q_0 - K_0 t \exp(-Ea/RT)$$

“Orden uno”:

$$Q = Q_0 \exp[k_0 t \exp(-Ea/RT)]$$

Estas sustituciones llevan a expresiones con dos variables independientes, t y T , y una variable dependiente Q , además de varios parámetros constantes que son Q_0 , k_0 , Ea y R . Existen dos métodos para calcular los parámetros cinéticos (Singh, 1994).

8.3.1.1. Método de regresión lineal.

Para poner en práctica este método es necesario haber calculado previamente las constantes de velocidad en, al menos, tres ensayos a diferentes temperaturas. La representación gráfica del logaritmo neperiano de k frente al inverso de la temperatura T es, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius, una línea recta con pendiente $-Ea/R$ y ordenada en el origen $\ln k_0$.

$$K = K_0 \exp(-Ea/RT) \longrightarrow \ln K = \ln K_0 - (Ea/R)(1/T)$$

Dado que esta línea debe ser recta, se utilizan procedimientos de regresión para calcular la pendiente y la ordenada en el origen y conseguir, en consecuencia, los valores de Ea y k_0 . Este método, denominado “de dos etapas”, da lugar, en general, a un intervalo de confianza relativamente grande de los valores de Ea , debido al pequeño número de temperaturas que se suelen seleccionar (Lund, 1983).

8.3.1.2. Método de regresión no lineal.

Este método, denominado también “de una etapa” (Lund, 1983), tiene una mayor aceptación (Arabshahi, 1982; Arabshahi y Lund, 1985; Cohen y Saguy, 1985; Haralampu y col., 1985). La energía de activación se calcula directamente a partir de la resolución de expresiones del tipo:

$$Q = Q_0 - K_0 t \exp(-Ea/RT) \text{ (Para reacciones de “orden cero”)}$$

$$Q = Q_0 \exp[k_0 t \exp(-Ea/RT)] \text{ (Para reacciones de “orden uno”)}$$

En estas expresiones que, como se ha visto anteriormente, resultan de incluir la ecuación de Arrhenius en las expresiones que habíamos obtenido para los “órdenes cero” y “uno”, se utilizan todos los datos que se dispongan de Q frente a tiempo (t) a cualquiera de las temperaturas (T) que se hayan ensayado. Para la resolución de estas expresiones es necesario contar con un programa informático capaz de resolver regresiones no lineales.

El método denominado “de una etapa” tiene como ventaja, frente al “de dos etapas”, que se incrementa el número de grados de libertad, con lo que se reduce el intervalo de confianza para la energía de activación (Lund, 1983).

Estas dos técnicas han sido aplicadas al análisis de la concentración de tiamina como función del tiempo y la temperatura, en sistemas modelo de humedad intermedia, para estimar las energías de activación según los dos métodos (Arabshahi, 1982). En este estudio se confirmó que los valores de E_a calculados según el método “de una etapa” tenían unos intervalos de confianza más estrechos que los calculados según el método “de dos etapas”. Debido a la amplitud de los intervalos de confianza, la comparación entre diferentes E_a calculadas según el método “de dos etapas” carecía virtualmente de sentido; sin embargo, la comparación de las E_a calculadas según el método “de una etapa” podía ser interpretada con sentido debido a la menor magnitud de los intervalos de confianza.

A pesar de la mayor simplicidad del método “de dos etapas”, se recomienda el uso del método “de una etapa” debido a que los intervalos de confianza obtenidos son menores, puesto que hay una mayor utilización de los datos analíticos para la estimación de la energía de activación, de la k_0 y del valor inicial del parámetro seleccionado (Arabshahi, 1982).

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo del trabajo experimental se llevó a cabo en tres etapas diferenciadas tal y como se muestra en la Figura 8. En una primera etapa (Estudio I) se evaluó la estabilidad de las vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles en una leche de crecimiento líquida expuesta a diferentes temperaturas: temperatura ambiente (23°C), 30°C y 37°C durante nueve meses. Para ello se empleó análisis de HPLC y microbiológico para la determinación de las vitaminas. En aquellos casos en los que existió un deterioro en el contenido de alguna vitamina se procedió a la selección de los modelos cinético-matemáticos, de orden “cero” o “uno”, que mejor describan la evolución de los diferentes indicadores físico-químicos (concentración de vitaminas), así, como los parámetros de las ecuaciones de deterioro. Para ello, se sometieron a una temperatura de abuso de 37°C y a otras condiciones de almacenamiento (23 y 30°C), con el fin de obtener la ecuación de vida útil de la leche de crecimiento a las diferentes temperaturas estudiadas.

En una segunda etapa (Estudio II) se evaluó la bioaccesibilidad del ácido fólico y del (6S)-5MTHF ó Metafolin® añadido a la leche de crecimiento mediante un modelo multicompartimental, controlado mediante un programa informático (TIM®) (TNO In vitro Model). Este modelo ha sido descrito por Minekus y col. (1995) y validado comparándolo con estudios en humanos y animales para distintas aplicaciones, tales como la digestión de alimentos y la disponibilidad para la absorción de nutrientes así como para el tránsito y absorción de compuestos bioactivos de los alimentos (Krul y col., 2001). El modelo permite el control de las condiciones fisiológicas que tienen lugar durante la digestión tales como: temperatura corporal de 37° C; curvas de pH en estómago relacionadas con la secreción de ácidos gástricos; el pH del intestino delgado mediante la secreción de bicarbonato; también la secreción de bilis y saliva, enzimas gástricas e intestinales, peristaltismo, vaciado gástrico y tránsito gastrointestinal del alimento. Las muestras fueron recogidas durante y al final de los ensayos de digestión para su posterior análisis y determinación del contenido de folatos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En una tercera etapa, se realizó un ensayo *in vivo* con ratas de experimentación (Estudios III y IV). En primer lugar, se evaluó cual de las dos sales de hierro adicionadas a la leche de crecimiento líquida presentó un mejor comportamiento desde el punto de vista metabólico (absorción y biodisponibilidad), mediante un balance mineral en un ensayo de depleción-repleción del hierro (Estudio III). Se comparó el sulfato ferroso, habitualmente usado en enriquecimiento de este tipo de productos, frente a un ingrediente, el bis-glicinato ferroso, que aparece como una interesante alternativa. En segundo lugar, se evaluó la biodisponibilidad de dos formas de folatos (ácido fólico y [6S]-5-MTHF) en la leche de crecimiento líquida combinadas con las dos formas de hierro anteriores (Estudio IV). Al igual

que en caso del hierro, se va a comparar la eficacia de un ingrediente novedoso, el [6S]-5-MTHF (Metfolin®) frente a la forma habitual de enriquecimiento, que es el ácido fólico. Se tomó como referencia el método oficial 974.31 de la AOAC (1998) para la biodisponibilidad del hierro, que describe un ensayo de repleción de la hemoglobina en ratas.

El estudio *in vivo* se dividió en dos periodos, un periodo de depleción y un periodo de repleción. Durante el *periodo de depleción*, los animales del Estudio III fueron alimentados con una dieta AIN-93G modificada sin hierro; mientras que los animales correspondientes al Estudio IV fueron alimentados con otra dieta AIN-93G modificada sin hierro y sin ácido fólico durante 4 semanas, hasta que alcanzaron un estado de deficiencia en hierro (Hb <6 g/100 ml). En la siguiente fase, el *periodo de repleción*, los animales fueron divididos en grupos homogéneos, y manteniendo la misma dieta se les suministró a través de la leche de crecimiento líquida los micronutrientes necesarios para cubrir las deficiencias causadas (según estudio) durante el *periodo de depleción*. Para el periodo de *repleción* y en el caso del Estudio III, se utilizó la leche de crecimiento I y II, con el objetivo de evaluar el comportamiento de las dos sales de hierro desde el punto de vista metabólico (absorción y biodisponibilidad) en un estado de anemia deficiente en hierro, mediante el ensayo de depleción-repleción en ratas. En el caso del Estudio IV, se utilizó la leche de crecimiento III-VI con el objetivo de evaluar la biodisponibilidad de las dos formas de folatos y, que combinación junto con las dos sales de hierro fue la idónea para alcanzar un estatus normal para el hierro después de un estado de deficiencia en hierro. El ácido fólico fue evaluado junto con el hierro pues son compuestos esenciales para el normal funcionamiento de la eritropoyesis y por tanto en la producción de los eritrocitos.

Para determinar la absorción de los compuestos de hierro se realizó un balance mineral del hierro en los animales sometidos al ensayo, determinando el contenido de hierro en heces, orina, la ingesta de hierro en la dieta y en la leche de crecimiento líquida. Para evaluar la incorporación del hierro a la hemoglobina y la recuperación de un estado anémico se evaluaron los parámetros sanguíneos de la serie roja (hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y la concentración de la hemoglobina corpuscular media) y parámetros bioquímicos tales como el hierro sérico, capacidad total de fijación del hierro y el porcentaje de saturación del hierro. La biodisponibilidad del hierro fue calculada como la eficacia de regeneración de la hemoglobina (ERH). Asimismo, se analizaron los depósitos de hierro en diferentes piezas anatómicas (corazón, hígado, bazo, riñón, parte proximal del intestino delgado). En cuanto a la biodisponibilidad del ácido fólico, se determinaron las concentraciones del mismo en la etapa de depleción y repleción, además de cuantificar los folatos en el suero y eritrocitos.

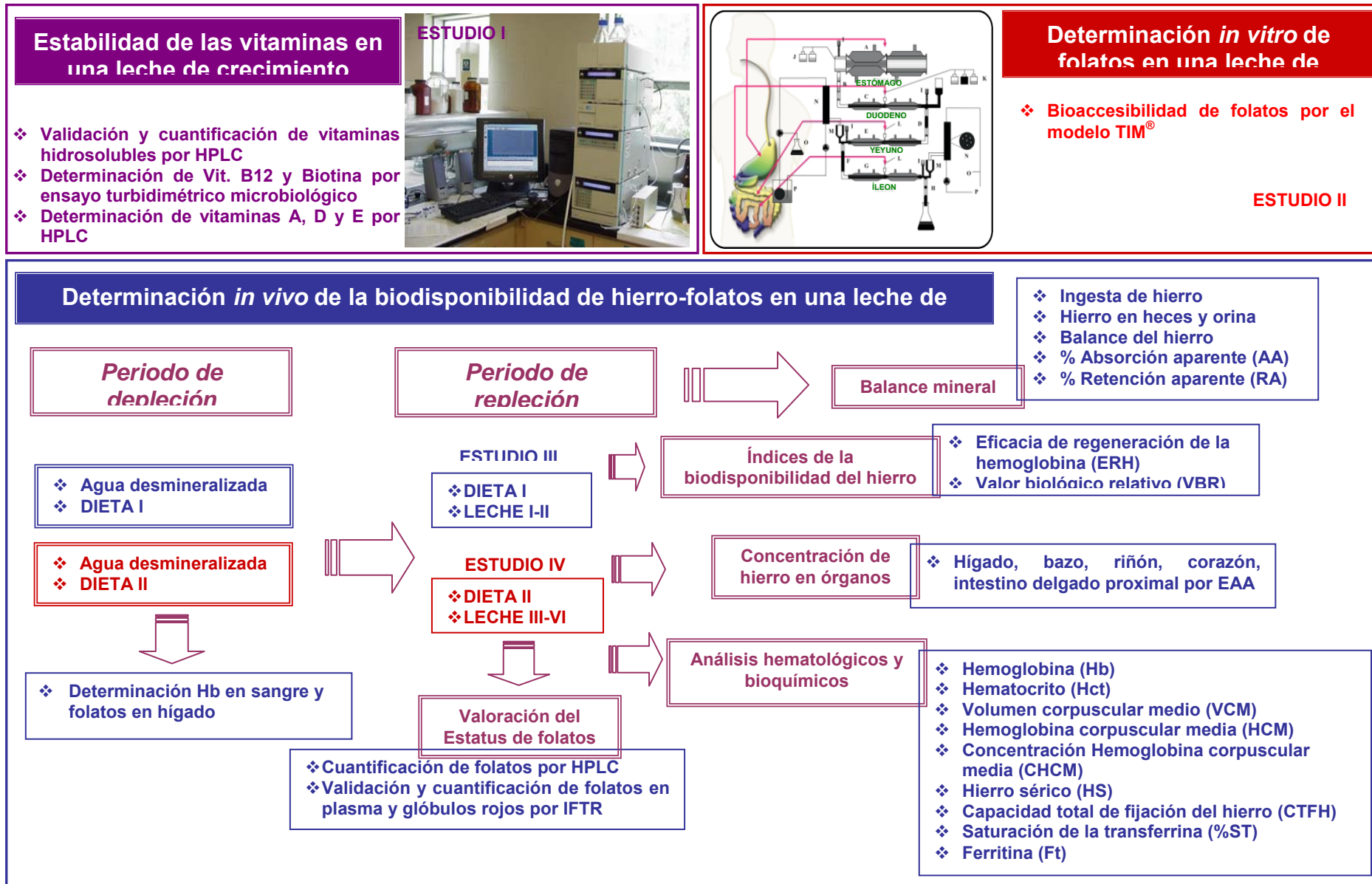


Figura 8. Esquema del diseño experimental

2. MATERIALES

2.1. Leche de crecimiento

Para la presente Tesis doctoral se seleccionó una leche de crecimiento líquida enriquecida en hierro y ácido fólico. Las fórmulas de continuación *junior* o leches 3 son fórmulas parcialmente modificadas y destinadas al consumo de la población infantil desde los 12 meses de vida, como paso intermedio entre la fórmula de continuación y la leche de vaca. Las fórmulas de crecimiento van enriquecidas con hierro, vitaminas y otros nutrientes.

Se elaboraron diferentes formulaciones con el objetivo de evaluar el efecto del hierro, empleando dos sales de hierro (Sulfato ferroso y Bisglicinato ferroso) y el efecto del ácido fólico, también empleando dos formas de folatos (Ácido fólico y (6S)-5MTHF o Metafolín®). Las diferentes formulaciones fueron desarrolladas y fabricadas por Hero España, S.A. (Alcantarilla, Murcia).

En las Tablas 8-11, se representan la composición centesimal de la leche de crecimiento, los componentes nutritivos y la composición del mix de vitaminas y minerales, para las diferentes tipos de leches de crecimiento.

Tabla 8. Composición centesimal (g/100g)

Leche base BPR	9,9617
Lactosa	3,2730
Mix vitaminas	0,1000
Mix minerales	0,0400
Aroma	0,0100
Agua de ósmosis	86,6153

Tabla 9. Componentes nutritivos (valores medios/100 ml)

Valor energético	Kj	266
	Kcal	63
Nutrientes		
Proteínas	g	2,0
Hidratos de carbono	g	8,0
Grasas	g	2,6
Ac. Linoléico	mg	400
Ac. Linolénico	mg	75

Tabla 10. Composición del mix de vitaminas de las diferentes leches empleadas en los diferentes estudios.

Vitaminas (g/100g mix)	Leche I	Leche II	Leche III	Leche IV	Leche V	Leche VI
Vitamina A	3.5897	=	=	=	=	=
Vitamina D	1.8600	=	=	=	=	=
Vitamina E	1.9200	=	=	=	=	=
Vitamina C	31.2500	=	=	=	=	=
Vitamina B₁	0.8427	=	=	=	=	=
Vitamina B₂	1.0400	=	=	=	=	=
Vitamina B₆	1.0244	=	=	=	=	=
Vitamina B₁₂	0.7000	=	=	=	=	=
Biotina	0.0180	=	=	=	=	=
Folato	NA	NA	0.1950 ^a	0.1950 ^a	0.2648 ^b	0.2648 ^b
Niacina	1.2000	=	=	=	=	=
Vitamina B₅	0.3626	=	=	=	=	=

^a Se adicionó el ácido fólico.

^b Se adicionó el (6S)-5MTHF

NA: No Adición, presente en la dieta AIN 93G

= Igual a la Leche I

Tabla 11. Composición del mix de minerales de las diferentes leches empleadas en los diferentes estudios.

Vitaminas (g/100 g mix)	Leche I	Leche II	Leche III	Leche IV	Leche V	Leche VI
Citrato trisódico*2H ₂ O	25.00	=	=	=	=	=
Hierro	17.50 ^a	18.88 ^b	17.50 ^a	18.88 ^b	17.50 ^a	18.88 ^b
Sulfato cinc*H ₂ O	6.25	=	=	=	=	=

^aAdición del sulfato ferroso.

^bAdición el Bisglicinato ferroso.

= Igual a la Leche I

Para la realización del estudio I, se empleó la leche III; para el estudio II, la leche III y V; para el estudio III, la leche I y II; y para el estudio IV, la leche III-VI (Tablas 10 y 11).

2.2. Dietas AIN93G para roedores

La dieta para roedores AIN-93 fue formulada para sustituir a la dieta AIN-76A que ha sido utilizada comúnmente hasta los años 90, y así mejorar el desarrollo de los animales de experimentación que las consumían (Reeves, 1997).

Para la realización de este ensayo se elaboraron dos tipos de dietas, tomando como referencia la dieta AIN-93G. Ambas dietas fueron utilizadas en los periodos de depleción y repleción. La dieta I, empleada en el estudio III, es una dieta deficiente en hierro, con el fin de disminuir las reservas de hierro y alcanzar una anemia por deficiencia en hierro en los animales. La concentración de hierro fue de 2.6 mg/Kg. En el estudio IV, la dieta II fue formulada sin la adición de la fuente de hierro y de la fuente de folato. Esta dieta está elaborada con un mix de vitaminas libres de folatos y de caseína, además del resto de ingredientes. La concentración de folatos en la dieta II fue de 0.37 ± 0.02 mg/Kg y de hierro fue similar a la dieta I. En la formulación de la dieta II, se adicionó succinilsulfatiazol al 1%, un agente antibacteriano que inhibe el crecimiento bacteriano del colon y por tanto la producción de folatos en el mismo. Es un análogo del ácido fólico e interfiere en la absorción y metabolismo del ácido fólico (Sepehr y col., 2003). Con ello evitamos la interferencia entre la producción endógena del ácido fólico del propio animal con la dosis exógena que es administrada a través de la leche de crecimiento líquida. Además de las dietas I y II se elaboraron otras dos dietas como controles. Las dietas controles son las dietas AIN-93G con y sin succinilsulfatiazol (Reeves, 1997). En la Tabla 12, se representa la composición de las dos dietas empleadas en los dos estudios.

Tabla 12. Composición de las diferentes dietas utilizadas en el ensayo *in vivo*.

INGREDIENTES	ESTUDIO III	ESTUDIO IV
	DIETA I	DIETA II
Caseinato cálcico	+	+
L-Cistina	+	+
Almidón de maíz	+	+
Maltodextrina	+	+
Sacarosa molida	+	+
Aceite de soja	+	+
Carboximetilcelulosa	+	+
MIX DE MINERALES	+ ¹	+ ¹
MIX DE VITAMINAS	+	+ ²
TBHQ	+	+
Bitartrato de colina	+	+

Contiene 1% succinilsulfatiazol

¹La sal de hierro fue eliminada de la dieta.

²El ácido fólico fue eliminado de la dieta.

TBHQ: Ter- Butilhidroquinona

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA

3.1. Estudio I

Para estudiar la estabilidad de las vitaminas, un número de muestras del mismo lote se dividieron en tres grupos y fueron sometidas a diferentes condiciones ambientales en cámaras de incubación durante un periodo de nueve meses. El contenido de las vitaminas excedían los niveles establecidos, con el objetivo de compensar las pérdidas que tendrían lugar durante la producción y/o almacenamiento. Las temperaturas seleccionadas fueron 23, 30 y 37°C. La temperatura de 23°C constituye la temperatura ambiental que hay en los establecimientos donde se venden estos productos, la temperatura de 37°C representa una temperatura que puede ser alcanzada bajo condiciones extremas, como la exposición directa del sol en verano, presente en establecimientos no acondicionados, etc, y la temperatura de 30°C se selecciono como una temperatura intermedia. La toma de muestras se realizó durante la primera semana de cada mes, y se analizaron las vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles.

3.1.1. Estufas de incubación

Para la realización de las pruebas de almacenamiento en condiciones forzadas se han utilizado dos cámaras de incubación a las temperaturas de 30 y 37°C: una estufa de incubación HERAEUS (Hanau, Alemania) y una cámara industrial, respectivamente.

3.1.2. DETERMINACIÓN DE RIBOFLAVINA, PIRIDOXINA, NICOTINAMIDA Y TIAMINA POR HPLC

El método empleado para la separación, identificación y cuantificación de las vitaminas hidrosolubles (Nicotinamida, Piridoxina, Tiamina, Riboflavina) ha sido descrito por Albalá-Hurtado y col. (1997).

Material

- Equipo de cromatografía líquida WATERS, formado por
 - Módulo de separación WATERS 2690
 - Detector de absorbancia diodo array WATERS 996
- Columna C₁₈ en fase reversa 250x4.6, 5 µm. WATERS Spherisorb ODS 2 (4.6 x 250 mm)
- Filtros HPLC 0,45 µm (Upchurc Scientific, Inc)
- Filtros HPLC 0,45 µm (Millipore)
- Filtros desechables 25 mm GD/X 0,45 µm (Whatman)
- Filtros de pliegues 20 cm (Albet)
- Balanza de precisión de 0.1 mg (Mettler, Toledo)
- Jeringuillas desechables de 5 mL
- Material de vidrio
- Viales de 2mL con tapón de rosca para automuestreador (WATERS)
- Sistema de filtración a vacío, compuesto por:
 - Bomba de vacío
 - Erlenmeyer de 1L
 - Porta filtros con pinza
- Multiagitador magnético (RT 10 Power IKA Werke)
- Centrífuga (Labofuge 400. Heraeus Instruments)

Reactivos

- Metanol para Cromatografía Líquida (Merck, Barcelona, España)
- Ácido Tricloroacético (Merck, Barcelona, España)
- Ácido acético glacial (Merck, Barcelona, España)
- Trietilamina (Calbiochem)
- Bicarbonato sódico (Merck, Barcelona, España)
- Ácido Octanosulfónico sódico (Sigma, Madrid, España)
- Estándar de nicotinamida (Sigma)
- Estándar de piridoxina (Clorhidrato de piridoxina) (Sigma)
- Estándar de Riboflavina (Merck)
- Estándar de tiamina (Clorhidrato de tiamina) (Sigma)

Preparación de los reactivos

- Ácido acético (AAc) al 2.4% (v/v)
- Bicarbonato sódico 5% (w:v)
- Ácido tricloroacético al 10%
- Fase móvil. Contiene 5mM del ácido octanosulfónico, 0.5% de trietilamina, 2.4% de ácido acético glacial y 15% de metanol, y se preparó de la siguiente manera: Se pesan

1.10 g de la sal sódica del ácido octanosulfónico en un vaso de precipitado y se añaden aproximadamente 800 mL de agua bidestilada, posteriormente se añaden 24 mL de ácido acético glacial y 5 mL de trietilamina, se mezcla y se ajusta el pH a 3.6 con ácido acético glacial o trietilamina. Se añaden 150 mL de metanol se vuelve a mezclar y se enrasa hasta 1L con agua bidestilada.

Preparación de las soluciones madre

- Solución de 500 ppm de Riboflavina: 0.1 g/ 100 mL de AAC (2.4%)
- Solución de 1000 ppm de Piridoxina: 0.1 g/ 100 mL de AAC (2.4%)
- Solución de 1000 ppm de Nicotinamida: 0.1 g / 100 mL de AAC (2.4%)
- Solución de 1000 ppm de Tiamina: 0.1 g / 100 mL de AAC (2.4%)

Preparación de la solución multipatrón

Se preparó una solución madre multipatrón (SM) con las cuatro vitaminas con una concentración de 20 ppm de nicotinamida, piridoxina, riboflavina y 40 ppm de tiamina. Para ello, se tomaron 2 mL de la solución madre de nicotinamida, piridoxina y 4 mL de riboflavina y tiamina, y se llevaron a un matraz de 100 mL enrasado con ácido acético al 2.4%. Se prepararon como mínimo 3 puntos para la recta multipatrón (Tabla 13)

Tabla 13. Preparación de la recta multipatrón

SM (mL)	Enrasar con Ác. Acético 2.4%	Nicotinamida/Piridoxina	Tiamina	Riboflavina
5	10 mL	10 ppm	20 ppm	10 ppm
2.5	10 mL	5 ppm	10 ppm	5 ppm
1	10 mL	2 ppm	4 ppm	2 ppm

Procedimiento

Se pesan por triplicado 10 g de leche de crecimiento líquida en tubos de centrifuga y se añaden 1g de ácido tricloroacético. Se agitan durante 15 min. y posteriormente se centrifugan a 2500 rpm durante 10 min. recogiendo el sobrenadante en un matraz aforado de 10 mL, el residuo sólido que queda se le añade 1 mL de ácido tricloroacético al 4% y se agita durante 10 min. De nuevo las muestras son posteriormente centrifugadas a 2500 rpm durante 10 min. y el sobrenadante obtenido se lleva a matraces de 10 mL y enrasando hasta el volumen final con ácido tricloroacético al 4%. Posteriormente se filtran las muestras con filtros de 0.45 µm antes de su inyección en el HPLC.

Condiciones cromatográficas

- Volumen de inyección: 25 µl
- Tiempo de recorrido cromatográfico: 20 minutos
- Presión, aprox. 1800 psi
- Flujo: 1 ml/min

- Longitud de onda “Nicotinamida”: 260 nm
- Longitud de onda “Piridoxina, Riboflavina y Tiamina”: 282 nm

Validación del ensayo

▪ Linealidad y Rango

La linealidad fue evaluada por dilución seriada a partir de la solución madre multipatrón. En la Tabla 14, se representa los valores obtenidos para cada una de las vitaminas presentes en la solución madre multipatrón.

Tabla 14 . Linealidad y Rango

	Rango (ppm)	R²
Nicotinamida	1,0368-19,44	0,999
Piridoxina	0,824-15,45	0,999
Riboflavina	0,6516-12,2175	0,999
Tiamina	5,235-15,705	0,995

▪ Precisión

Seis determinaciones con concentraciones inferiores, medias y superiores fueron evaluadas obtenidas de la solución madre multipatrón fueron utilizadas para el cálculo de la precisión. En la Tabla 15, se muestran los coeficientes de variación de cada uno de las vitaminas a diferentes concentraciones.

Tabla 15. Precisión

	Inferior		Media		Superior	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)
Nicotinamida	0,387	3,036	2,9552	0,7268	10,7240	1,4027
Piridoxina	0,944	3,802	5,1700	2,2210	10,5050	3,4070
Riboflavina	2,0978	3,1491	4,1176	0,6301	7,0776	0,9316
Tiamina	5,496	5,15	7,8622	5,2390	10,2900	2,1077

▪ Límite de detección y cuantificación

Para determinar los límites de detección y cuantificación se empleó el criterio de Long y Winefordner (1983), el cual es el criterio más usado para los procedimientos cromatográficos. En la Tabla 16, se representa los límites de detección y cuantificación de las diferentes vitaminas hidrosolubles.

Tabla 16. Límite de detección y cuantificación

	Límite de detección(ppm)	Límite de cuantificación (ppm)
Nicotinamida	0,1386	0,1805
Piridoxina	0,4818	0,6958
Riboflavina	0,0995	0,1336
Tiamina	3,4253	3,9546

▪ Recuperación

La recuperación fue realizada por la adición de una cantidad conocida para cada una de las vitaminas. Se realizaron duplicados durante tres días consecutivos. Las recuperaciones

medias obtenidas fueron para la nicotinamida del 82.50%, piridoxina del 62.69%, riboflavina del 79.72% y para la tiamina del 85.49%.

3.1.3. Determinación de vitamina B12. Método microbiológico

La determinación de la vitamina B₁₂ está orientada con lo especificado en el Manual Merck de Microbiología (2000). La técnica utilizada es un ensayo turbidimétrico microbiológico, en el que se empleó como microorganismo de ensayo el *Lactobacillus leichmanii*.

La determinación de la vitamina B₁₂ se realizó en un laboratorio externo y acreditado. De manera resumida el tratamiento de la muestra se realizó con tampón de B12 (fosfato, cítrico y bisulfito) a pH=6. Se autoclave durante 10 min. y posteriormente se enrasó a 100 mL y se ajustó el pH a 6. Se escogieron dos concentraciones teóricas y se realizaron sus correspondientes diluciones hasta obtener valores esperados de 0.24 ng/mL. A partir de las dos soluciones obtenidas de 0.24 ng/mL teóricas se procedió a realizar las diluciones con agua bidestilada y caldo de vitamina B12 de Merck, hasta obtener concentraciones de 0.048 y 0.096 ng teóricas/tubo. Cada una de las diferentes diluciones se realizó por triplicado, por lo que se obtienen 12 tubos por muestra. Los tubos de soluciones patrones se realizaron a partir de diferentes volúmenes de soluciones patrón de 0.024 ng/mL y al que se le añadieron diferentes volúmenes de agua bidestilada y caldo vitamina B12. La inoculación fue de 100 μ l de la solución de inóculo/tubo. Se incubaron a 37°C durante 14-20 h. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una λ de 546 nm.

3.1.4. Determinación de biotina y ácido pantoténico. Método microbiológico

Al igual que la determinación de la vitamina B12 se realizó en un laboratorio externo y acreditado. La técnica fue por ensayo turbidométrico microbiológico y el microorganismo empleado fue el *Lactobacillus plantarum*.

La muestra se trató con ácido sulfúrico 1N durante 2 h a una temperatura de 121°C. Se realizaron diluciones para obtener valores esperados de 0.2 ng/mL. Para ello se escogieron dos concentraciones teóricas y se hicieron sus correspondientes diluciones hasta obtener los valores esperados de 0.2 ng/mL. A partir de las dos soluciones obtenidas de 0.24 ng teórico de biotina y ácido pantoténico por mL, se procedió a realizar las diluciones con agua bidestilada y caldo Biotina de Merck hasta obtener finalmente 0.4 y 1.0 ng teórico/tubo. Cada una de las diferentes diluciones se realizó por triplicado, por lo que se obtuvieron 12 tubos por muestra. En los tubos se inocularon 100 μ l de la solución de inóculo/tubo. La incubación tuvo lugar a 37°C durante 14-20 h. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una λ de 546 nm.

3.1.5. Determinación de ácido ascórbico (Vitamina C) por HPLC

El método empleado para la separación, identificación y cuantificación del ácido ascórbico (Vitamina C) ha sido descrito por Esteve (1995)

Material

- ✓ Equipo de cromatografía líquida WATERS, compuesto por:
 - Módulo de separación WATERS 2690 o bomba inyector manual WATERS 600 con horno independiente
 - Detector de absorbancia diodo array WATERS 996
 - PC con programa EMPOWER PRO para procesamiento de los datos
- ✓ Cartucho fase reversa Lichospher 100 RP-18 (5 µm) (Ref. 1.50211 Merck)
- ✓ Filtros HPLC 0.45 µm (Ref. A-103X Upchurch Scientific, Inc.)
- ✓ Filtros HPLC 0.45 µm HA (Ref. HATF04700 Millipore)
- ✓ Filtros desechables 25 mm GD/X de 0.45 µm (Ref. 6870-2540 Whatman)
- ✓ Filtros de pliegues de 20 cm diámetro
- ✓ Balanza de precisión de 0.1 mg
- ✓ Jeringuillas desechables de 5 mL
- ✓ Material de vidrio
- ✓ Viales de 2 mL con tapón de rosca para automuestreador (Ref. WAT270946 Waters)
- ✓ Tubos eppendorf de 1 mL
- ✓ Sistema de filtración a vacío, compuesto por:
 - Bomba de vacío
 - Erlenmeyer de 1 L para filtración a vacío
 - Porta filtros con pinza
- ✓ Microjeringuilla de 25 µL (Ref. 1802 RNE Hamilton)
- ✓ Agitador magnético

Reactivos

- ✓ Ácido metafosfórico 1%. Pesar 10 g de ácido metafosfórico (Ref. 1.00546, Merck) en un vaso de precipitado de 250 mL, trasvasar a una erlenmeyer de 2L y enrasar con agua destilada.
- ✓ Fase móvil, tampón fosfato 0,1M. Pesar 13,609 g de Potasio dihidrógeno fosfato (Panreac), disolver en agua destilada, ajustar el pH a 3.5 con ácido fosfórico y llevar a 1L con agua. Filtrar a vacío con filtros de 0.45 µm.
- ✓ Ácido ascórbico (Merck)
- ✓ Patrones de ácido ascórbico:
 - Solución madre de 600 ppm. Pesar 60 mg de ácido ascórbico y llevar a 100 mL con ácido metafosfórico.

- Patrón de 6 ppm. 0.1 mL de la solución madre se lleva a 10 mL con ácido metafosfórico.
- Patrón de 15 ppm. 0.25 mL de la solución madre en 10 mL de ácido metafosfórico.
- Patrón de 30 ppm. 0.5 mL de la solución madre en 10 mL de ácido metafosfórico.
- Patrón de 60 ppm. 1 mL de la solución madre en 10 mL de ácido metafosfórico.

Procedimiento

Se pesan 10-12 g de la muestra en un matraz aforado de 50 mL y enrasar con ácido metafosfórico 1%. Agitar en un agitador durante 10 min. filtrar en filtros de papel y posteriormente a través de filtros de 0.45 µm. El extracto obtenido se empleó para su posterior análisis.

Las condiciones del análisis, fueron:

- Flujo de 1mL/min.
- Volumen de inyección de 20 µL.
- Longitud de onda de 245 nm.

3.1.6. Determinación de las vitaminas A y E

Para la determinación de la vitamina A se tomó como referencia el método aplicado por la FIL (Federación Internacional de Lechería) FIL 142:1990, y en el caso de la vitamina E el método oficial de la AOCS (American Oil Chemists' Society) Ce 8-89.

Principio

La muestra es saponificada, extraída con disolvente orgánico y separado de la matriz del alimento para posteriormente ser cuantificada por HPLC con un detector ultravioleta.

Aparatos

- ✓ Sistema cromatográfico equipado con:
 - Bomba cuaternaria
 - Inyector automático
 - Columna y precolumna Novapak C18
 - Detector de ultravioleta
 - Detector de fluorescencia

Reactivos

- ✓ Agua destilada
- ✓ Vitamina A alcohol
- ✓ Vitamina E 97%

- ✓ Etanol 96%
- ✓ Éter de petróleo
- ✓ Hidróxido sódico 1N
- ✓ BHT (Butil-HidroxiTolueno)
- ✓ Metanol (calidad HPLC)
- ✓ Solución acuosa de KOH (50:50)
- ✓ Solución acuosa y alcohólica de KOH
- ✓ Ácido L-ascórbico
- ✓ Solución de ascorbato sódico
- ✓ Eluyente: mezcla de metanol:agua (92:8)

Preparación de los patrones

A partir de una solución madre de 500 ppm de vitamina A se preparan los patrones de la recta de calibración cuyo intervalo de concentraciones está comprendido entre 1 y 50 ppm. En el caso de la vitamina E, a partir de una solución madre de 1000 ppm se preparan los patrones cuyo intervalo está comprendido entre 10 y 500 ppm.

Procedimiento

Se pesan 40 mL de la muestra en un matraz de saponificación, se añaden 25 mL de la solución acuosa de KOH, 10 mL de la solución de ascorbato sódico y 50 mL de etanol. Se introduce un imán y se tapa el matraz con papel de aluminio para evitar se exposición a la luz. Se coloca el matraz en una placa calefactora y se conecta a un sistema de refrigeración. Cuando alcance la ebullición se mantiene durante 30 min. posteriormente se enfría, limpiando primero el refrigerante con unos 20 mL de agua destilada. Con ayuda de una varilla y un embudo se transfiere el contenido del matraz a un embudo de decantación de color ámbar. Para limpiar el matraz y verter el contenido en el embudo de decantación, primero se lava con dos partes de agua destilada de 30 mL, dos porciones de etanol de 10 mL y finalmente dos porciones de éter de petróleo de 40 mL. Se tapa el embudo de decantación y se agita durante 30 seg.

Se deja reposar hasta que se separen las dos fases. Se recoge la parte acuosa (inferior) a un segundo embudo de decantación ámbar, dejando la fase etérea en el primer embudo. Al embudo con la parte acuosa se le añade 10 mL de etanol y 40 mL de éter de petróleo, se agita y se deja separar las dos fases. Se recoge la fase acuosa en un matraz de decantación y la fase etérea se transfiere junto con la fase etérea del primer embudo de decantación. Se hace una última extracción de la fase acuosa y se recoge la fase etérea, transfiriéndola junto a las otras fases etéreas. La fase etérea se lava tres veces con 40 mL de la solución acuosa y alcohólica de KOH, agitando y descartando la fase acuosa.

Posteriormente se lava con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Transferir la fase etérea a un matraz seco, el matraz de decantación se lava dos veces con 10 mL de éter de petróleo y se transfiere al matraz con la fase etérea. Se añade 20 mg de BHT y se evapora a sequedad en un rotavapor a una temperatura inferior a 40°C. Se disuelve en metanol y el volumen obtenido es inyectado en el cromatógrafo.

Condiciones cromatográficas

- Flujo de 1.6 mL/min
- Eluyente: Metanol:Agua (92:8)
- Temperatura columna 40°C
- Detector UV: 325 nm
- Detector fluorescencia: excitación 295 nm y emisión 340 nm
- Tiempo de retención de la vitamina A (2-3 min.) y la vitamina E (16 min.)

3.1.7. Determinación de vitamina D

Para la determinación de la vitamina D se aplicó como método de referencia el proyecto de norma europea e internacional UNE que ha sido tramitado como proyecto de norma UNE, prEN 12821, sobre la determinación de vitamina D mediante cromatografía líquida de altas características. Medición de colecalciferol (D3) y ergocalciferol (D2).

Principio

Saponificación y extracción de la muestra. Posteriormente se realizó una cromatografía en fase normal para eliminar las impurezas que interfieren en la cuantificación, que se realizó mediante HPLC en fase inversa con detección por ultravioleta.

Aparatos

- ✓ Sistema cromatográfico equipado con:
 - Bomba cuaternaria
 - Inyector automático
 - Columna y precolumna Novapak C18 para la cuantificación y columna Kromasil-Si para la purificación
 - Detector de ultravioleta

Reactivos

- ✓ Agua destilada
- ✓ Vitamina D2 y D3
- ✓ Etanol 96%
- ✓ Éter de petróleo

- ✓ Hidróxido sódico 1N
- ✓ BHT
- ✓ Metanol (calidad HPLC)
- ✓ Solución acuosa de KOH (50:50)
- ✓ Solución acuosa y alcohólica de KOH
- ✓ Ácido L-ascórbico
- ✓ Solución de ascorbato sódico
- ✓ Eluyente: Mezcla de Metanol:Agua (92:8)
- ✓ Eluyente preparativa: n-hexano:2-propanol (995:5)

Preparación de los patrones

A partir de una solución madre de 400 ppm de vitamina D3 se prepararon los patrones para la recta de calibración, cuyo intervalo de concentraciones variaba de 20 a 800 µg/L. También se preparó el patrón interno de vitamina D2 a partir de un patrón de 400 ppm.

Procedimiento

Pesar en una balanza analítica, la cantidad necesaria de muestra en un matraz de saponificación. Se añaden 2 mL del patrón interno (vitamina D2), junto con 25 mL de la solución acuosa de KOH, 10 mL de la solución de ascorbato sódico y 50 mL de etanol. EL matraz de tapa con papel de aluminio para evitar su exposición a la luz. Se coloca el matraz en una placa calefactora y se conecta al sistema refrigerante. Una vez alcanzado la ebullición se mantiene durante 30 minutos, luego se enfría limpiando el refrigerante con unos 20 mL de agua destilada. Se transpasa el contenido del matraz a un embudo de decantación de color ámbar. Para limpiar los restos que quedan en el matraz, se limpia con 60 mL de agua destilada, 10 mL de etanol y finalmente 80 mL de éter de petróleo y se transvasan al embudo de decantación. Se tapa el embudo de decantación y se agita, se deja en reposo hasta que se separan las dos fases. Se recoge la fase acuosa (inferior) y se lleva a otro embudo de decantación, dejando la fase etérea en el primer embudo. A este segundo embudo se le añade 10 mL de etanol y 40 mL de éter de petróleo, se agita y se deja reposar, hasta que se separen de nuevo las dos fases. Se recoge la fase acuosa (inferior) y la fase etérea se transfiere junto con la otra fase etérea del primer embudo. Con esta última fase acuosa se repite el mismo mecanismo de antes, se recoge la fase etérea y se transvasa al primer embudo junto con las otras dos fases etéreas. En el embudo que contiene la fase etérea se adiciona tres veces 40 mL de solución acuosa y alcohólica de KOH, se agita vigorosamente y se descarta la fase acuosa. Posteriormente se lava con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. La fase etérea se transfiere a un matraz seco y lo que queda en el embudo de decantación se lava dos veces con 10 mL de éter de petróleo y se lleva al matraz. Se añaden 20 mg de BHT al matraz y se evapora hasta la sequedad en

un rotavapor a una temperatura inferior a 40°C. Se redisuelve con 2 mL del eluyente para la purificación (hexano:2-propanol). Se prepara las condiciones cromatograficas de purificación: - volumen de inyección: 500 µL, - Flujo: 2.0 mL/min. – Eluyente: n-hexano:2-propanol (995:5), - Columna Kromasil 100 Si 5 µm 4.6x250 mm, - Detector UV: 265 nm.

Se desenroscó el capilar de salida del detector de manera que puedan recogerse todas las fracciones que se eluyan. Posteriormente, se inyecta u patrón conjunto de vitamina D2 y D3 y se identifican los picos de los mismos. Luego se inyectan las muestras y se recogen en un matraz de corazón de 10 mL la fracción que se eluye entre 0.5 min. antes y 1 min, después del tiempo de retención de la vitamina D. La fracción obtenida se introduce en el rotavapor hasta su sequedad y se redisuelve en 300 µL de metanol y a continuación se pasa a un vial para su cuantificación. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: - Flujo: 1.6 mL/min. – Eluyente: Metanol:Agua (92:8), - Columna y precolumna Novapak C18, - Tª columna: 40°C, - Detector UV: 325 nm.

3.1.8. Estudio cinético de degradación de las vitaminas

Una expresión general de la velocidad de reacción para la degradación cinética puede ser expresada de la siguiente manera: (Libuza y Riboh., 1982; Ramaswami y col., 1989; Van Boekel, 1996)

$$-d[C]/dt = k [C]^m$$

donde “C” es el valor cuantitativo (concentración, mg/g o mg/ml) del producto de degradación en estudio (en este caso las vitaminas), “K” es la constante de velocidad de reacción, y “m” es el orden de la reacción. Ya que la degradación de las vitaminas en estudio fue encontrada a seguir una cinética de primer, $m = 1$, integrando la ecuación anterior en función del tiempo y a diferentes temperaturas, obtenemos la siguiente ecuación:

$$\ln([C_t]/[C_0]) = -Kt \text{ ó } \ln([C_0]/[C_t]) = Kt$$

donde [Co] es la concentración inicial de la vitamina en estudio a tiempo 0 y [Ct] es la concentración de la vitamina después de un tiempo t a una determinada temperatura.

La relación entre la velocidad de reacción de la degradación de la vitamina con la temperatura fue cuantificada por la ecuación de Arrhenius:

$$K = K_0 \cdot \exp(-E_a/RT)$$

donde E_a es la energía de activación de la reacción de degradación (Kcal/mol), R es la constante universal de los gases (1,987 Kcal/mol °K), T es la temperatura absoluta (°K), y K_0 es la constante pre-exponencial (tiempo⁻¹).

3.2. Estudio II

3.2.1. Determinación de la bioaccesibilidad dinámica de folatos por el modelo TIM®

Material

- pH-metro micro 2000, Crisol (Barcelona, España)
- Balanza de precisión modelo Explorer de Ohaus (Suiza).
- Agitador magnético M-500, Darlab (Barcelona)
- Centrifuga Beckman JA-10.
- Modelo computerizado gastrointestinal, TIM® (TNO, Holanda)
- Homogeneizador (Omnimixer)
- Baño de agua-ebullición
- Baño de agitación ajustable a 37° C.
- Membrana de diálisis: tamaño 6 de 27/32"-21.5 mm, 12-14000 Daltons (cut-off). (Referencia: Dialysis Tubing- Visking Code DTV 12000.06.000, Medicell Int. L.T.D. Inglaterra).
- Bolsas de diálisis URIAS de 1.5 L y de 90 cm. (ref. 600100)
- Modelo TIM®. Food and Nutrition Institute (TNO). Zeist. Holanda

Método

Para determinar la disponibilidad dinámica de los folatos se empleó un modelo multicompartimental, controlado mediante un programa informático (TIM®), utilizado para la determinación de la biodisponibilidad de numerosos compuestos presentes en los alimentos, entre ellos el ácido fólico. En este modelo, los sucesivos procesos dinámicos que tienen lugar durante la digestión fisiológica en estómago e intestino son simulados. Este modelo ha sido descrito por Minekus et al. (1995) y validado comparándolo con estudios en humanos y animales para distintas aplicaciones, tales como la digestión de alimentos y la disponibilidad para la absorción de nutrientes así como para el tránsito y absorción de compuestos bioactivos de los alimentos (Krul et al., 2001). Este sistema (TIM®) es el único, que permite el estudio de la estabilidad, tránsito, digestibilidad, absorción y bioconversión de nutrientes, así como de sustancias químicas y farmacológicas en el tracto gastrointestinal. El TIM permite el control de las condiciones fisiológicas que tienen lugar durante la digestión tales como: temperatura corporal de 37° C; curvas de pH en estómago relacionadas con la secreción de ácidos gástricos; el pH del intestino delgado mediante la secreción de bicarbonato; también la secreción de bilis y saliva, enzimas gástricas e intestinales, peristaltismo, vaciado gástrico y tránsito gastrointestinal del alimento. Unas unidades de membrana semipermeable conectadas a los compartimentos que representan a yeyuno e ileon permiten la absorción continua de compuestos digeridos y agua. Las muestras son recogidas durante y al final de los ensayos de digestión para su posterior análisis y

determinación del contenido de folatos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las condiciones utilizadas de pH, enzimas, y velocidad del tránsito intestinal en el TIM[®] se ajustaron a las condiciones fisiológicas para la digestión infantil.

Reactivos

- Bicarbonato sódico: NaHCO₃ (Merck, ref. 106329)
- Hidróxido sódico: NaOH (Merck, ref. 106498)
- Cloruro sódico: NaCl (Merck, ref. 106404)
- Cloruro potásico: KCl (BDH, ref. 101085)
- Proteasa (Sigma, P-5147)
- Pepsina de estómago de cerdo: actividad 2100 U/mg (Sigma, P-7012)
- Sales biliares de porcino (Sigma, P-8631)
- Ácido fólico (Sigma, F-7876)
- (6S)-5-MTHF (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Pancreatina porcina (Sigma, P-1750)
- Lipasa (Rhizopus lipasa F-AP 15, Amano Pharmaceuticals, Japón)
- Tripsina de páncreas bovino tipo III (Sigma, T-8253)

i) Soluciones enzimáticas

Previamente a la elaboración de las soluciones enzimáticas, se preparó una solución gástrica que, junto al bicarbonato sódico 1 M y agua destilada, se preparó el jugo gástrico con la que realizamos todas las soluciones enzimáticas.

➤ Solución gástrica con pepsina de estómago de porcino: 42 mg (90000 unidades) de pepsina de estómago de cerdo: actividad 2100 U/mg (P-7012, Sigma) fueron disueltas en jugo gástrico hasta un volumen de 150 g, ajustando a pH 4. Se homogeneizó y se almacenó en hielo.

➤ Solución gástrica con lipasa de Rhizopus: 37.5 mg de lipasa, actividad: 150000 U/g se disuelven con 150 g de jugo gástrico. Se mezcló homogéneamente y se almacenó en hielo.

➤ Pancreatina porcina al 7%: se tomaron 10.5 g de pancreatina y se añadieron 150 g agua destilada. Se mezcló durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la solución durante 20 minutos a 9000 rpm y 4°C usando tubos policarbonados, obteniéndose el sobrenadante que se utilizó en el experimento, almacenándolo en hielo.

➤ Sales biliares de porcino al 4%: se disolvieron 10 g de bilis de porcino en 260 g de agua destilada y se homogenizaron.

Solución electrolítica del intestino delgado

Para la preparación de la solución electrolítica, previamente se elaboró la solución electrolítica del intestino delgado concentrada. Para ello se tomó 250 g de cloruro sódico al que se le añadió 30 g de cloruro potásico y se llevaron a un volumen de 2174 g con agua destilada. Con ésta solución electrolítica del intestino delgado concentrada se preparó la solución electrolítica que se utilizó en el experimento, tomando 43.5 g de la solución electrolítica concentrada y diluyéndola hasta un volumen de 1000 g con agua destilada.

Solución de diálisis para yeyuno e ilion

Se prepararon dos botellas de diálisis para el dializado del yeyuno e ilion. Para su preparación se tomó 100 g de solución electrolítica de intestino delgado, se introdujo en una bolsa de diálisis y se relleno completamente con agua destilada (2300 ml/botella).

Solución residual inicial estomacal

5 g de pepsina con 5 g de lipasa se introdujeron previos al inicio del experimento en el compartimiento estomacal, ajustándolo a pH 2.

Solución residual inicial duodenal

Minutos antes del inicio del experimento se introdujeron en el compartimiento del duodeno: 15 g de solución pancreática, 15 g de solución electrolítica del intestino delgado, 30 g de solución de sales biliares y 1 ml de tripsina.

Solución de tripsina (2000 μ g/ml)

Se diluyeron 200mg de tripsina en 100 g de la solución gástrica. Se dividió esta solución en viales Eppendorf, y se congelaron a -20° C.

Material

- Membrana de diálisis: tamaño 6 de 27/32"-21.5 mm, 12-14000 Daltons. (Medicell Int. L.T.D. Inglaterra).
- Bolsas de diálisis de 1.5 L y de 90 cm. (URIAS, ref. 600100)

Sección 1.02 Procedimiento

El modelo gastrointestinal se compone de cuatro compartimentos conectados que representan el estómago, duodeno, yeyuno e ileon, respectivamente. (Figura 9) Cada compartimiento está construido por una pared de cristal exterior y una membrana de silicona interior. Ésta membrana flexible exterior ésta rodeada por agua a 37° C para contraer la pared y que sea mayor el grado de mezcla del alimento con las enzimas y soluciones

secretadas y para simular los movimientos peristálticos del tracto gastrointestinal. El pH está constantemente midiéndose en cada compartimiento y regulándose por la adición de ácido clorhídrico (estómago) y bicarbonato sódico (intestino delgado). Los valores de pH, así como el vaciado gástrico y el paso del alimento al intestino delgado se controlan de acuerdo a una previa introducción de curvas basadas en las condiciones fisiológicas encontradas en la literatura. Los jugos gástricos, lipasas y pepsinas y bilis, jugos pancreáticos y soluciones electrolíticas son añadidos gradualmente en el estómago y duodeno, respectivamente. La fracción del alimento, introducido en el modelo, que pasa a través de las membranas de diálisis semipermeables conectadas al yeyuno e ileon es la que se calcula como bioaccesible. La fracción que no es absorbida, y por tanto no pasa a través de estas membranas de diálisis, es recogida tras su paso por la válvula ileon-cecal.

Al inicio del experimento, 300 g de muestra, llamado “alimento ingerido”, se introducen en el compartimiento del estómago. Los dializados del yeyuno e ilion fueron recolectados a las 0-1, 1-2, 2-3, 3-5 horas para medir la fracción bioaccesible de folatos en la matriz líquida. La fracción no bioaccesible de folatos, la cual es transportada al intestino grueso, se recoge como “liberado ileal” durante las 0-1, 1-2, 2-3, 3-5 horas. Al final del experimento los residuos que permanecen en los compartimientos se recogen y se analizan para calcular el porcentaje de recuperación de folatos. Directamente, después de la toma de cada muestra, 1% (w/v) de ascorbato sódico se les añadió a cada muestra para prevenir reacciones adversas. Se mezclaron bien y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

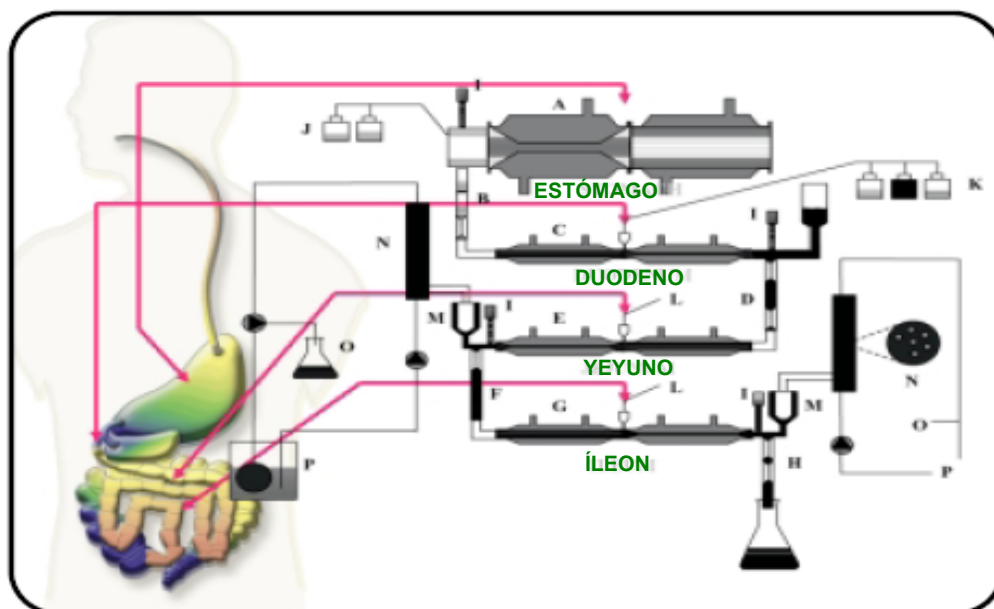


Figura 9.- Esquema del modelo gastrointestinal in vitro (TIM). Compartimiento gástrico; B. esfínter pilórico; C. compartimiento duodenal; D. válvula peristáltica; E. compartimiento yeyunal; F. válvula peristáltica; G. compartimiento ileal; válvula ileocecal; I. electrodos de pH; J. botes de secreción gástrica con ácido y enzimas; K. botes de secreción duodenal con bilis, bicarbonato y pancreatina; L. secreción de bicarbonato para el control del pH intestinal; M. sistema de prefiltrado; N. sistema de membrana de diálisis semipermeables; O. sistema de absorción de agua; P. sistema cerrado de diálisis. (Minekus y col., 1995).

Cálculo de la bioaccesibilidad dinámica de los folatos in Vitro

- El porcentaje recuperado (%R) de folatos (balance de masas) ha sido calculado con la fórmula:

$$\%R = ((\text{Folato}_{\text{dializado}} + \text{Folato}_{\text{liberado}}) * 100 / (\text{Folato}_{\text{comida}}))$$

donde: Folato_{dializado} es el contenido de folatos absorbido a nivel del yeyuno e ilion, en µg/100 g (fracción bioaccesible); Folato_{liberado} es el contenido de folatos del total de la muestra que pasa por la válvula ileocecal al ciego, en µg/100 g (fracción no bioaccesible); y Folato_{comida} es el contenido en folatos de la muestra de matriz líquida introducida en el sistema expresada en µg/100 g.

- La bioaccesibilidad de los folatos, se expresa como una fracción de la ingesta y se calcula con la fórmula:

$$\text{Bioaccesibilidad folato (\%)} = (\text{Folato}_{\text{dializado}} / \text{Folato}_{\text{comida}}) * 100$$

- El término excretado hace referencia al contenido de folato que es degradado durante la digestión *in vitro* o permanece adherido a las paredes de los compartimentos que componen el sistema gastrointestinal. Se calcula como una estimación sobre el contenido bioaccesible y no bioaccesible:

$$\text{Excretado} = \text{Folato}_{\text{alimento}} - (\text{Fracción Bioaccesible} + \text{Fracción no bioaccesible})$$

3.2.2. Cuantificación de folatos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Material

- Interfase D-7000 (Merck-Hitachi)
- Detector de fluorescencia 7485 (La Chrom., Merck-Hitachi)
- Detector ultravioleta 7400 (La Chrom., Merck-Hitachi)
- Bomba cuaternaria de gradiente L-7100
- Sistema de muestreo automático L-7200
- Columna: LiChrocart® 250-4 mm, HPLC Cartridge, precolumna: LiChrocart®4-4, LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) guard columns.
- Sistema de adquisición de datos (MILLERNNIUM chromatography manager)
- Columnas LiChrolut®, extracción en fase sólida intercambio fuerte de aniones (SAX),
- Filtros desechables Whatman® de nylon con lecho de polipropileno, de 25 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro.
- Baño termostático Precistern de Selecta (Barcelona, España).
- pH-metro mico pH 2000 de Crison (Barcelona, España).

- Placa de agitación magnética Selecta (Barcelona, España).
- Agitador de tubos Selecta (Barcelona, España).
- Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J2-21

Método

El método de extracción, purificación y determinación de los folatos utilizado ha sido el descrito por Vahteristo y col., (1996), por Pfeiffer y col., (1997), y Konings (1999), respectivamente.

Patrones

El estándar utilizado fue: (6S)-5-MTHF (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La pureza del estándar fue determinada según el procedimiento desarrollado por Van den Berg en 1994. Para la obtención de los patrones se realizaron una serie de soluciones previas:

- Solución A: 19.07 g de borato sódico 0.05 M en 1 litro de agua mili-Q.
- Solución B: Se tomaron 10 ml de la solución A y se añadieron 0.4 ml de mercaptoetanol. Posteriormente se enrasó con agua mili-Q hasta un volumen de 100 ml.
- Solución de los patrones: se pesaron 10 mg de patrón y se enrasaron en un matraz de 10 ml con la solución B para alcanzar una concentración de cada patrón de 1000 µg/ml.
- Solución de almacenamiento de los patrones: para almacenar los patrones, se tomó 1 ml de cada solución de patrón y se enrasó hasta 10 ml con ácido ascórbico al 1%, conteniendo cada eppendorf una concentración de 100 µg/ml. Posteriormente se almacenaron en alícuotas a – 18°C hasta su uso.

Reactivos

- Ches C 2885 (Merck, Barcelona, España)
- Hepes H 4034 (Merck, Barcelona, España)
- Sodio L (+) ascorbato (Panreac, Barcelona, España).
- 2-Mercaptoetanol (Merck, Barcelona, España)
- Hexano (Merck, Barcelona, España)
- Metanol (Merck, Barcelona, España)
- K₂HPO₄ (Merck, Barcelona, España)
- 2-Mercaptoetanol (Merck, Barcelona, España)
- Acetato sódico (Probus, Barcelona, España)
- Cloruro sódico (Merck, Barcelona, España)
- Ácido ascórbico (Merck, Barcelona, España)
- Acetonitrilo (Merck, Barcelona, España)
- Ácido Ortofosfórico 85% (PO₄H₃) (Merck, Barcelona, España).

- Potasio dihidrogenofosfato (PO_4KH_2) (Merck, Barcelona, España).
- Ácido acético (Merck, Barcelona, España).
- Sulfato amónico (Merck, Barcelona, España).

Soluciones

- *Ches-Hepes*: 50mM Ches/50 mM Hepes a pH 7.85 (ajustado con KOH 6%) conteniendo 2% de ascorbato L (+) sódico y 2-mercaptoetanol 10 mM.
- *Solución de purificación*: se disolvió 4.0827 g de K_2HPO_4 en 100 ml de agua Milli-Q, y se ajustó el pH a 7 para posteriormente añadirle 100 μl de 2-mercaptoetanol.
- *Solución de elución*: se diluyó 0.4102 g de acetato sódico, 5 g de cloruro sódico y 0.5 g de ácido ascórbico en 50 ml de agua Milli-Q.
- *Tampón fosfato 30 mM pH 2.2*: diluir 4.08 g de PO_4KH_2 en un litro de agua Milli-Q ajustando el pH a 2.2 con la solución de 2 ml de PO_4H_3 /litro de agua Milli-Q.
- Ácido acético 1M. Se adicionó 44.89 ml de ácido acético en un matraz de 1L y se enrasó con agua destilada.
- Buffer 0.05M acetato potásico a pH 5 con 2-mercaptoetanol 10 mM. 9.94 de acetato potásico en 2L de agua destilada y 1.39 ml de 2-mercaptoetanol por cada litro de la solución anterior.

Preparación de las muestras

Extracción

El (6S)-5-MTHF fue extraído de los dializados mediante la adición 25 ml de tampón Ches-Hepes (Sigma-Aldrich), 50mM Ches/50 mM Hepes (ajustado pH 7.85 con KOH) y conteniendo 2% de ascorbato sódico y de 2-mercaptoetanol 10 mM. Se homogeneizaron las muestras en un Omnimixer, sometiendo cada muestra a atmósfera de nitrógeno durante 10 segundos. Los tubos se introdujeron en un baño en ebullición durante 10 minutos, manteniendo el baño en agitación constante. Tras este tiempo, las muestras fueron enfriadas inmediatamente en hielo. Una vez las muestras estaban frías, se homogeneizaron y transfirieron a matraces de 50 ml donde se enrasaron con tampón de extracción. Estos extractos fueron almacenados a -20°C hasta su utilización (Pfeiffer et al., 1997, Konings, 1999).

Purificación

Se tomaron 5 ml de extracto de cada una de las muestras analizadas y se pasaron a través de filtros de 0,45 μm de tamaño de poro (filtros desechables Whatman® de nylon con lecho de polipropileno, de 25 mm de diámetro). Posteriormente a la filtración las muestras fueron purificadas para una mejor cuantificación. Muchos procedimientos de purificación

incluyen el intercambio iónico fuerte a través de sílice u otras resinas (Rebello, 1987), de tal forma que los folatos son retenidos en base a sus cargas y recogidos con tampones apropiados o soluciones de elución (Vatheristo et al., 1996). En nuestro caso, fue preciso la preparación de las columnas de afinidad o cartuchos (columnas LiChrolut®, para extracción en fase sólida intercambio fuerte de aniones (SAX), 500 mg). Los cartuchos se lavaron con hexano (2 veces), seguido de metanol, agua Mili-Q y finalmente se hizo pasar la solución de purificación. Se vertieron entonces las muestras en los cartuchos y se pasaron lentamente a través de estos. Antes de que acabaran de pasar las muestras se lavaron las paredes del cartucho con agua Mili-Q. Posteriormente, se les añadió entre 2 ml de solución de elución para ser recogidos en viales previamente pesados. El volumen recogido fue la muestra a cuantificar en HPLC.

Análisis por HPLC

Previamente al análisis, se estabilizó el sistema, por lo que se hizo pasar un gradiente de acetonitrilo y tampón potasio fosfato 30 mM, pH 2.2. Las condiciones iniciales del gradiente para la fase móvil fueron 6 % de acetonitrilo y un 94 % de buffer fosfato que se mantuvieron de manera isocrática durante los primeros 6 minutos. Posteriormente la concentración del acetonitrilo fue en aumento lineal hasta un 25 % durante 20 minutos. El tiempo de adquisición de datos fue de 30 minutos y el volumen de inyección fue de 40 µL. La absorbancia de todos los folatos en elución fue monitorizada por un detector de ultravioleta y uno de fluorescencia. El (6S)-5-MTHF se detecta tanto en fluorescencia como en ultravioleta, aunque únicamente fue detectado por fluorescencia por su mayor sensibilidad, con unos valores de excitación y emisión de 280 nm y 350 nm respectivamente. La identificación de los picos se basó en el tiempo de retención, comparando los picos en fluorescencia y ultravioleta de los patrones con las muestras problema.

3.3. Estudios III y IV

3.3.1. Animales

Las ratas de experimentación fueron suministradas por el animalario de la Universidad de Murcia (establecimiento autorizado para la producción y distribución de animales de laboratorio según el Real Decreto 223/1988, sobre la protección de los animales para experimentación y otros fines científicos, publicada en el B.O.E núm. 67 de 18 de Marzo de 1988). Para cada estudio se utilizó un total de 24 ratas macho del tipo Sprague-Dawley (SD) recién destetadas (21 días de edad), con un peso corporal medio de 40-50 g. Los animales se mantuvieron en una habitación con la temperatura, humedad relativa y periodos de luz-oscuridad controlada durante todo el estudio.

Periodo de depleción (Figura 10). Durante este periodo las 12 ratas fueron distribuidas en jaulas colectivas (3 animales/jaula) en un periodo de tiempo de 4 semanas, con el objetivo de disminuir las reservas corporales de hierro mediante una dieta deficiente en hierro (AIN-93G). Para determinar el estado anémico de los animales al final de este periodo, se realizó una extracción de sangre de la vena lateral de la cola para cuantificar los niveles de hemoglobina. El estado anémico se establece con niveles de hemoglobina <6 g/100 ml, según el método oficial de la AOAC 974.31 (1998).

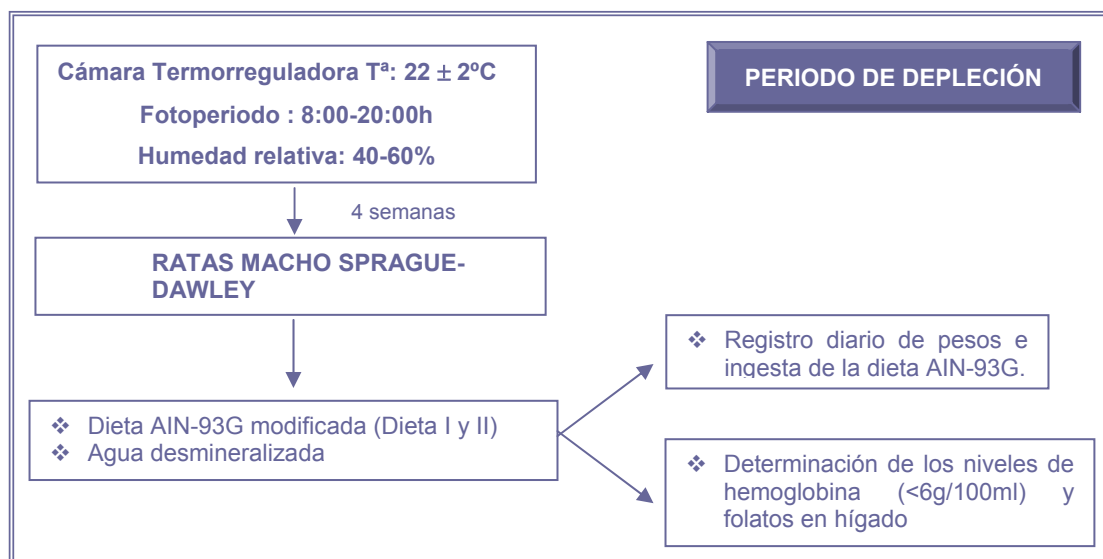


Figura 10. Esquema del periodo de depleción durante el estudio *in vivo* en ratas.

Periodo de repleción (Figura 11). Una vez alcanzados los niveles de hemoglobina deseados para considerar a los animales anémicos, se dividieron en dos grupos homogéneos (n = 12) con un peso corporal y concentración de hemoglobina similares. Los animales fueron alimentados con la misma dieta utilizada en el *periodo de depleción*, y a través de la leche de crecimiento se les proporcionó la fuente de hierro y el tipo de ácido fólico, dependiendo del estudio (Tablas 9 y 10). El balance mineral duró cuatro semanas. Se registró el peso corporal del animal, la cantidad de orina y heces que excretaban, la cantidad de comida que consumían y el volumen de leche que ingerían diariamente. Al final de cada balance las ratas fueron sacrificadas, determinándose los niveles hematológicos y bioquímicos en sangre. Al mismo tiempo se extrajeron diferentes piezas anatómicas para posteriormente determinar la concentración de hierro en las mismas. En el caso del hígado, parte del mismo se empleó para la determinación de folatos.

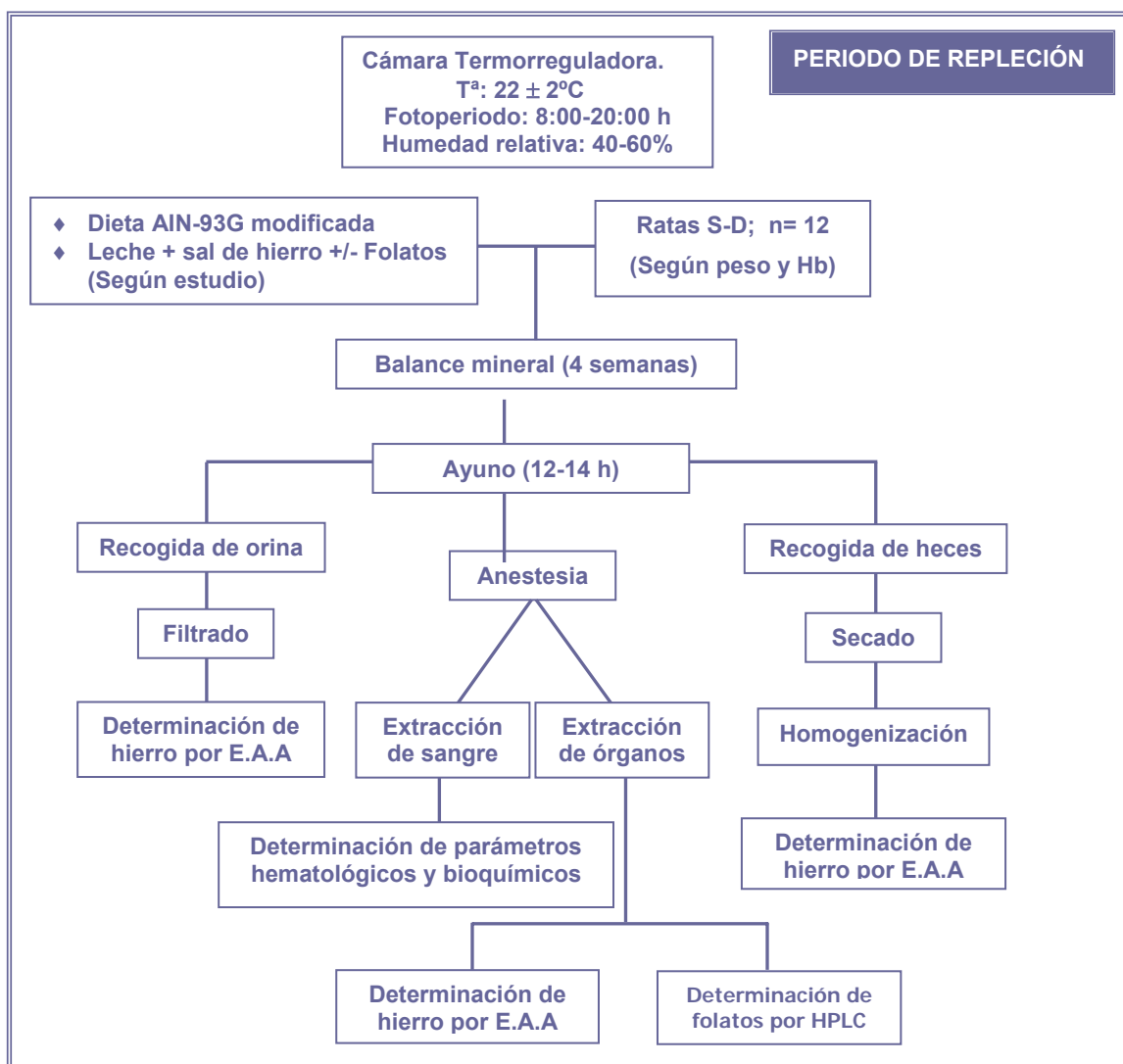


Figura 11. Esquema del periodo de repleción durante el estudio *in vivo* en ratas.

3.3.2. Pauta de recogida de datos y toma de muestras

3.3.2.1. Ingesta de alimento, peso corporal, recogida de heces y orina

Reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido nítrico (HNO₃) (Merck, Darmstadt, Alemania)

Material

- Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Filtros de membrana de acetato de celulosa de 25 mm de diámetro y 0.45 µm de poro (Iwaki glass, Japón)
- Jaulas metabólicas de plástico (Techniplastgazzada, Bugugiatte, Italia)
- Jeringuillas de 10 ml (Becton Dickinson, New Jersey, USA)
- Papel de filtro Whatman nº 41, exento de cenizas (Midstone, Kent, Inglaterra)

- Colectores urinarios de 120 cc (Enfa S.A., Barcelona, España)

Procedimiento

En las Figuras 10 y 11, se han representado los dos periodos en los que quedan divididos cada uno de los estudios. En el *periodo de depleción* (Figura 10), las ratas fueron pesadas al inicio y, diariamente, a lo largo de las cuatro semanas. El alimento y el agua de bebida (desionizada) se proporcionaron *ad libitum*, para cada grupo de 12 animales, cuantificando diariamente la ingesta de alimento y el volumen de agua.

Durante el *periodo de repleción* (Figura 11) las ratas fueron introducidas individualmente en jaulas metabólicas, manteniendo las mismas condiciones ambientales que en el *periodo de depleción*. Previo al inicio del *periodo de repleción*, las jaulas, los recipientes de polietileno utilizados para la recogida de heces y orina, los comederos, bebederos y los distintos botes para la recogida de muestras, se lavaron en HNO₃ al 10% y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua desionizada. Durante este periodo se registró los pesos de los animales, el volumen de orina e ingesta de la comida y la leche de crecimiento líquida.

Las muestras de heces y orina se prepararon para la determinación mineral del hierro. A la orina se le añadió HCl 0.5 M en una proporción de 10mL HCl/l de orina (López y col., 2000), luego se filtró a través de papel Whatman nº 41 exento de cenizas para eliminar restos de comida, heces o cualquier material grosero, y posteriormente, la orina limpia, se hizo pasar a través de filtros de 0.45 µm de poro. La orina recogida de esta manera se almacenó a una Tª de 4°C. Las heces se depositaron directamente en recipientes estériles de plástico conservándose a una Tª de -20°C.

3.3.2.2. Anestesia y disección

Reactivos

- Éter etílico ((CH₃CH₂)₂O) (Probus, Barcelona, España)
- Solución salina fisiológica (9 g de NaCl/l)
- Anticoagulante heparina (Analema, Vigo, España)

Material

- Algodón hidrófilo.
- Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Bolsas de plástico de cierre hermético 80 x 120 mm (Vidra Foc, España)
- Campana de anestesia

- Guantes de latex (Ibertex, Barcelona, España)
- Hoja de bisturí nº 23 y 10 (Romed, Wilnis, Holanda)
- Mangos de bisturí nº 3
- Jeringuillas de 5 ml (Becton Dickinson, Huesca, España)
- Agujas estériles 0.6 x 25 mm (Becton Dickinson, Huesca, España)
- Pinzas de disección
- Tabla de disección
- Tijeras de disección
- Tubos de poliestireno con base redonda

Procedimiento

Al final de cada periodo de balance, se procedió al sacrificio de las ratas de la siguiente manera: los animales fueron introducidos en una campana de anestesia, en cuyo interior se depositaron varios trozos de algodón impregnados con éter etílico. Una vez anestesiados fueron pesados e inmovilizados mediante la fijación de sus extremidades en una tabla de disección. Posteriormente, se les practicó una disección a la altura de la línea media abdominal, se separó la piel y luego se abrió la cavidad abdominal permitiendo un perfecto acceso a la aorta abdominal al desplazar lateralmente las vísceras. De la aorta abdominal se extrajo un volumen de sangre de 4-5 ml y se transfirió a los tubos de plástico impregnados con heparina. Posteriormente, se procedió a la disección de las piezas anatómicas seleccionadas (corazón, hígado, bazo, riñón derecho, y los 20 primeros centímetros del intestino delgado, además de la tibia y fémur derecho). Durante todo el ensayo se cumplió la normativa sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre), además este estudio fue autorizado por el comité de bioética de la Universidad de Murcia.

3.3.2.3. Preparación de las muestras

Reactivos

- Solución salina fisiológica (9 g de NaCl /L)

Material y equipo utilizado

- Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Bolsas de plástico de 80 x 120 mm (vidra Foc, España)
- Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- Liofilizador modelo TD-3-MP (FTS System, New York, U.S.A.)

Procedimiento

Las piezas anatómicas se congelaron y liofilizaron durante un periodo de 3 días. Pasado ese tiempo se trituraron, homogenizaron y se almacenaron en bolsas herméticas hasta su posterior análisis. Previo a la liofilización se abrió el corazón para conseguir un mayor desangrado, así como el intestino (sección longitudinal) con el fin de eliminar todos los restos de los procesos digestivos de acuerdo a la metodología descrita por Kreuzer y Kirchgessner (1991).

Las muestras fecales, una vez congeladas a una T^a de -20°C, se descongelaron y posteriormente se desecaron durante 3 días a 80°C en una estufa de aire forzado hasta obtener un peso constante. Posteriormente se homogenizaron y se almacenaron hasta su posterior análisis.

En cuanto a la preparación de la orina, ésta no requirió una preparación especial, salvo la adición de HCL 0.5 M y el proceso de filtración según se ha descrito en la sección anterior.

3.3.3. Obtención de cenizas y determinación del contenido mineral

Las piezas anatómicas liofilizadas se pesaron e incineraron íntegramente en un horno mufla a 550° C durante 24 h, salvo en el caso del hígado del que sólo se utilizó una cantidad de 0.5 g del liofilizado. De las muestras de heces desecadas y molidas se incineró también una pequeña porción (0.5 g) del homogeneizado durante 12 h a 550° C. Una vez obtenidas las cenizas de las piezas anatómicas y de las muestras de heces se procedió a la determinación del contenido en hierro por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) siguiendo el método 985.35 de la AOAC (1999).

Reactivos

- Ácido clorhídrico (37%) calidad Suprapur (HCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido nítrico calidad Suprapur (HNO₃) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Solución stock-patrón de 1000 mg/l (Fluka, Buchs, Suiza):
 - Hierro (nº cat. 44093)

Material y equipo

- Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- Crisoles de porcelana C-4 (KPM, Berlín, Alemania)
- Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 3100 (Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A.)
- Horno mufla modelo L3/S (Naberthem, Bremen, Alemania)
- Matracas aforados de 50 y 100 ml (Pobel, Madrid, España)
- Placa calefactora (P-Selecta, Barcelona, España)

Limpieza del material de laboratorio

Todo el material de vidrio y los crisoles de porcelana utilizados en la determinación del contenido mineral fueron lavados durante 24h en ácido nítrico (HNO₃) al 10% para arrastrar cualquier tipo de impurezas adheridas a las paredes del material, y posteriormente enjuagados tres veces con agua desionizada.

Procedimiento

Una vez obtenidas las cenizas de las distintas piezas anatómicas y muestras de heces, éstas fueron recogidas con 2 mL de HNO₃ puro y 5 ml de (HCl 37%), agitando suavemente sobre una placa calefactora hasta aproximadamente la mitad de su evaporación. La solución obtenida fue llevada a un matraz de 50 ml, al cual se le adicionaron los volúmenes de lavado de los crisoles, enrasando finalmente con agua desionizada. En el caso de las muestras de orina, se tomaron alícuotas de 0.5 ml de la misma y se llevaron hasta 50 ml en un matraz aforado, para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica. Las condiciones instrumentales se encuentran descritas en la Tabla 17.

Elemento mineral	Longitud de onda (nm)	Apertura de rendija (nm)	Sensibilidad del chequeo (mg/L)
Fe	248.3	0.2	5.0

La calibración se realizó utilizando distintas diluciones del patrón del elemento mineral. En la Tabla 18 se muestran las concentraciones escogidas para elaborar la recta de calibrado así como la ecuación de la recta obtenida.

Mineral	Concentración (ppm)					Ecuación de la recta ¹	R ²
	1	2	3	4	5		
Fe	*	*	*	*	*	$y = 2,86 \cdot 10^{-3} + 4,76 \cdot 10^{-2} x$	0,998

* Concentración (ppm) utilizada para elaborar la ecuación de la recta.

¹ Definición de las variables dependientes e independientes de la ecuación de la recta.
y = concentración del elemento; x = absorbancia.

3.3.4. Determinación de parámetros hematológicos

Reactivos

- Anticoagulante heparina (Analema, Vigo, España)

Material y equipo

- Contador celular Vet ABC (Veterinary Animal Blood Counter, ABX Diagnostics, Montpellier, Francia)
- Tubos de plástico de poliestireno (Vidra Foc, España)
- Viales eppendorf (Tecnoquim S.L. España)

Procedimiento

El análisis hematológico fue realizado inmediatamente después de la obtención de la muestra sanguínea para evitar cualquier tipo de alteración debida al paso del tiempo. En el caso de no ser analizada en las 2-3 horas siguientes, la sangre se refrigeró a 4°C durante 24 horas. De cada animal se obtuvieron 4-5 mL de sangre en total, distribuyéndose en viales eppendorf de 1.5 ml de capacidad para la posterior determinación de la concentración de hemoglobina, valor hematocrito, proteínas plasmáticas, y los índices eritrocitarios: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) en un contador celular. El resto de la sangre fue distribuida en tubos de plástico de poliestireno previamente heparinizados para la determinación de los parámetros bioquímicos.

3.3.5. Determinación de parámetros bioquímicos

Material y equipo

- Analizador químico OLYMPUS, modelo AU600 (Olympus Optical España, Barcelona)
- Kit IRON OSR6186 (Olympus Optical España, Barcelona)
- Kit UIBC OSR6124 (Olympus Optical España, Barcelona)
- Kit Ferritin OSR61138 (Olympus Optical España, Barcelona)

Procedimiento

La valoración de los parámetros bioquímicos se realizó sobre el plasma heparinado de las muestras de sangre centrifugadas a 3500 x g durante 10 min.

- Hierro sérico. Para la cuantificación del hierro sérico se utilizó una prueba colorimétrica que utiliza como cromógeno el TPTZ o Tripiridiltriacina [2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triacina]. El fundamento de este método consiste en liberar el hierro que se encuentra unido a la transferrina por la adición de un tampón de glicocola a un pH de 1,7. Posteriormente el hierro férrico liberado es reducido a hierro ferroso por la acción del ácido ascórbico. El hierro ferroso reacciona entonces con el TPTZ para formar un complejo color azul. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de hierro y es cuantificable bicromáticamente a 600/800 nm. La concentración de hierro es calculada automáticamente por el analizador químico OLYMPUS.
- Capacidad de fijación del hierro insaturado (CFHI). Su determinación tiene lugar por adición a pH alcalino de un exceso de hierro a la muestra, con el objetivo de saturar los sitios de fijación del hierro a la transferrina. Después de la reducción por el cloruro de hidroxilamonio del hierro no unido, éste reacciona con el agente cromógeno, nitroso-PSAP o 2-nitroso-5(N-propil-N-sulfopropilamino) fenol, para formar un complejo coloreado de color verde. La diferencia entre la cantidad de hierro añadido y la cantidad de hierro medido

representa la capacidad de fijación del hierro insaturado. Combinando las cuantificaciones de la CFHI con la concentración de hierro sérico se obtiene la capacidad total de fijación del hierro (CTFH), que es la concentración máxima de hierro fijado por las proteínas séricas, principalmente la transferrina.

- **Ferritina.** La determinación de la ferritina se realizó por un ensayo inmunoturbidimétrico. Las reacciones aglutinantes del látex se deben a la agregación de gotas de látex de anticuerpos, siempre que haya cantidad suficiente de antígeno. Los inmunocomplejos formados en disolución dispersan la luz proporcionalmente a su tamaño, forma y concentración. Si hay exceso de anticuerpos, el incremento de la cantidad de antígeno aumenta la dispersión. Los turbidímetros miden la luz incidente por reflexión, absorción o dispersión. La base de este ensayo es la cuantificación de la pérdida de intensidad lumínica transmitida (aumento de la absorbancia) a través de partículas suspendidas en disolución, como consecuencia de complejos formados durante la reacción antígeno-anticuerpo. El reactivo Olympus Ferritin es una suspensión de partículas de látex de poliestireno, de tamaño uniforme, revestidas con antígeno antiferritínico-anticuerpo policlonal de conejo. La combinación de una muestra (que contiene ferritina) con el reactivo Olympus produce una mezcla aglutinante. Esta mezcla se cuantifica espectrofotométricamente en los analizadores bioquímicos.

3.3.6. Cálculos de la evaluación del balance mineral

En la evaluación del balance mineral se procedió a la determinación del porcentaje de absorción aparente mineral respecto a la ingestión del mineral estudiado por los animales según el tipo de dieta y leche de crecimiento líquida. El porcentaje de absorción aparente (AA) es el porcentaje de absorción del mineral ingerido respecto al excretado. Este parámetro fue calculado según la siguiente fórmula:

$$AA (\%) = \frac{(I - EH)}{I} \times 100$$

Donde I es la cantidad de mineral ingerido por al rata durante el balance; EH es la cantidad de mineral excretado en las heces durante el periodo de balance.

3.3.7. Índices de la biodisponibilidad del hierro

3.3.7.1. Porcentaje de biodisponibilidad del hierro

Se valoró utilizando la determinación de la eficacia de la regeneración de la hemoglobina (ERH). Ésta se calcula como el porcentaje del hierro añadido consumido que fue retenido en la hemoglobina circulante (Mahoney y Hendrick, 1982; Forbes y col., 1989).

$$\text{ERH (\%)} = [(\text{HbFe}_f - \text{HbFe}_i) \times 100] / \text{InFeTo}$$

Donde HbFe_f es el contenido de hierro de la hemoglobina al final del periodo de repleción; HbFe_i es el contenido de hierro de la hemoglobina al inicio del periodo de repleción, y InFeTo es la ingesta de hierro total durante el periodo de repleción, calculado como el producto de la concentración del hierro dietético por la cantidad de alimento consumido por cada animal durante el experimento. La HbFe fue calculada considerando un volumen de sangre de 0.067 ml sangre / g peso corporal de la rata, y un contenido de hierro en la hemoglobina de 3.4 mg Fe / g Hb, según la siguiente fórmula:

$$\text{HbFe} = \text{Peso corporal (g)} \times \text{Hb (g/l)} \times 0.067 \text{ mL / g} \times 3.4 \text{ mg Fe / g Hb}$$

3.3.7.2. Valor de la biodisponibilidad relativa (VBR)

Calculado como el cociente entre la ERH de la fuente de hierro estudiada (BF) y la ERH de la fuente de hierro de referencia (sulfato ferroso).

$$\text{VBR} = (\text{ERH del BF} \times 100) / (\text{ERH del SF})$$

3.3.8. Cuantificación de folatos en hígado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Material

- Interfase D-7000 (Merck-Hitachi)
- Detector de fluorescencia 7485 (La Chrom., Merck-Hitachi)
- Detector ultravioleta 7400 (La Chrom., Merck-Hitachi)
- Bomba cuaternaria de gradiente L-7100
- Sistema de muestreo automático L-7200
- Columna: LiChrocart® 250-4 mm, HPLC Cartridge, precolumna: LiChrocart®4-4, LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) guard columns.
- Sistema de adquisición de datos (MILLERNNIUM chromatography manager)
- Columnas LiChrolut®, para extracción en fase sólida intercambio fuerte de aniones (SAX), 500 mg.
- Filtros desechables Whatman® de nylon con lecho de polipropileno, de 25 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro.
- Baño termostático Precistern de Selecta (Barcelona, España).
- pH-metro mico pH 2000 de Crison (Barcelona, España).
- Placa de agitación magnética Selecta (Barcelona, España).
- Agitador de tubos Selecta (Barcelona, España).
- Centrifuga refrigerada Beckman, modelo J2-21

Método

El método de extracción, purificación y determinación de los folatos utilizado ha sido el descrito por Vahteristo y col., (1996), Pfeiffer y col., (1997), y Konings (1999), respectivamente.

Patrones

Los estándares utilizados fueron: tetrahidrofolato (THF), 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) y 5-formil-tetrahidrofolato (5-FTHF) obtenido por Sigma Chemical, España. La pureza de los estándares fue determinada según el procedimiento desarrollado por Van den Berg (1994). Para la obtención de los patrones se realizaron una serie de soluciones previas:

- Solución A: 19.07 g de borato sódico 0.05 M en 1 litro de agua mili-Q.
- Solución B: Se tomó 10 ml de la solución A y se añadió 0.4 ml de mercaptoetanol. Posteriormente se enrasó con agua mili-Q hasta un volumen de 100 ml.
- Solución de los patrones: se pesó 10 mg de patrón y se enrasó en un matraz de 10 ml con la solución B para alcanzar una concentración de cada patrón de 1000 µg/ml.
- Solución de almacenamiento de los patrones: para almacenar los patrones, se tomó 1 ml de cada solución de patrón y se enrasó hasta 10 ml con ácido ascórbico al 1%, conteniendo cada eppendorf una concentración de 100 µg/ml. Posteriormente se almacenaron en alícuotas a – 18°C hasta su uso.

Reactivos

- Ches C 2885 (Merck, Barcelona, España)
- Hepes H 4034 (Merck, Barcelona, España)
- Sodio L (+) ascorbato (Panreac, Barcelona, España).
- 2-Mercaptoetanol (Merck, Barcelona, España)
- Hexano (Merck, Barcelona, España)
- Metanol (Merck, Barcelona, España)
- K₂HPO₄ (Merck, Barcelona, España)
- 2-Mercaptoetanol (Merck, Barcelona, España)
- Acetato sódico (Probus, Barcelona, España)
- Cloruro sódico (Merck, Barcelona, España)
- Ácido ascórbico (Merck, Barcelona, España)
- Acetonitrilo (Merck, Barcelona, España)
- Ácido Ortofosfórico 85% (PO₄H₃) (Merck, Barcelona, España).
- Potasio dihidrogenofosfato (PO₄KH₂) (Merck, Barcelona, España).
- Ácido acético (Merck, Barcelona, España).
- Sulfato amónico (Merck, Barcelona, España).

Soluciones

- *Ches-Hepes*: 50mM Ches/50 mM Hepes a pH 7.85 (ajustado con KOH 6%) conteniendo 2% de ascorbato L (+) sódico y 2-mercaptoetanol 10 mM.
- *Solución de purificación*: se disolvió 4.0827 g de K_2HPO_4 en 100 ml de agua Milli-Q, y se ajustó el pH a 7 para posteriormente añadirle 100 μ l de 2-mercaptoetanol.
- *Solución de elución*: se diluyó 0.4102 g de acetato sódico, 5 g de cloruro sódico y 0.5 g de ácido ascórbico en 50 ml de agua Milli-Q.
- *Tampón fosfato 30 mM pH 2.2*: diluir 4.08 g de PO_4KH_2 en un litro de agua Milli-Q ajustando el pH a 2.2 con la solución de 2 ml de PO_4H_3 /litro de agua Milli-Q.
- *Ácido acético 1M*. Se adicionó 44.89 ml de ácido acético en un matraz de 1L y se enrasó con agua destilada.
- *Buffer 0.05M acetato potásico a pH 5 con 2-mercaptoetanol 10 mM*. 9.94 de acetato potásico en 2L de agua destilada y 1.39 ml de 2-mercaptoetanol por cada litro de la solución anterior.

Extracción de la enzima conjugasa en tejido renal

La solución enzimática fue preparada siguiendo las pautas descritas por Gregory et al. (1984), a partir de riñones de cerdo frescos recién sacrificados, que se obtenían en el matadero de Mercamurcia (El Palmar, Murcia). La enzima purificada se denomina pteroylpoliglutamil- γ -carboxipeptidasa o folato conjugasa; EC3.4.22.12. Para su obtención los riñones fueron decapsulados, y una porción de 400 g de tejido renal fue homogeneizada en un Omnimixer con 1200 ml de 2-mercaptoetanol 10mM a 2°C (baño de hielo). La suspensión obtenida se ajustó a pH 5,0 con ácido acético 1M. Seguidamente, se centrifugó a 7.500 rpm a 2°C durante 20 minutos en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante obtenido se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 2L, y se introdujo en un baño a 50°C durante 2 horas en agitación continua. Trascorrido este tiempo se volvió a centrifugar a 7.500 rpm durante 20 minutos a 2° C. La fracción sobrenadante se precipitó entre el 50 y el 75% de saturación con amonio sulfato. De nuevo, se centrifugó en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante (reservando el precipitado) el cual fue resuspendido en un volumen mínimo de tampón 0,05 M de acetato potásico a pH 5 el cual contenía 2-mercaptoetanol 10mM. Este volumen de precipitado se introdujo en una membrana de diálisis de unos 40 cm de longitud, 21,5 mm de diámetro y con tamaño de poro de 12-14.000 daltons de peso, y se introdujo en un matraz Erlenmeyer con 2L de tampón 0,05 M durante toda una noche.

El dializado con la preparación de conjugasa dio lugar a un volumen aproximado de 110 ml (24 mg de proteína /ml), los cuales fueron almacenados en pequeñas volúmenes a -35°C hasta su uso.

Preparación de las muestras

Extracción

Los folatos fueron extraídos del hígado mediante dilución en tampón con adición de antioxidantes y aplicando un tratamiento de calor. Las soluciones buffer tienen un pH próximo a la neutralidad (6.5-7.85). La preparación de las muestras y los estándares se debe realizar en condiciones de reducida luminosidad y evitando el contacto con el aire, preferiblemente bajo atmósfera de nitrógeno a fin de proteger los compuestos folatos.

Se tomaron de 2 a 3 g de hígado liofilizado y se le adicionó 25 ml de tampón Ches-Hepes (Sigma-Aldrich), 50mM Ches/50 mM Hepes (ajustado pH 7.85 con KOH) y conteniendo 2% de ascorbato sódico y de 2-mercaptoetanol 10 mM. Se homogeneizaron las muestras en un Omnimixer, sometiendo cada muestra a atmósfera de nitrógeno durante 10 segundos. Los tubos se introdujeron en un baño en ebullición durante 10 minutos, manteniendo el baño en agitación constante. Tras este tiempo, las muestras fueron enfriadas inmediatamente en hielo. Una vez las muestras estaban frías, se homogeneizaron y transfirieron a matraces de 50 ml donde se enrasaron con tampón de extracción. Estos extractos fueron almacenados a -20° C hasta su utilización (Pfeiffer et al., 1997, Konings, 1999).

Purificación

La mayoría de los folatos en los alimentos están en forma de poliglutamatos. Muchos métodos de análisis requieren que estos sean hidrolizados hasta mono o di-glutamatos antes de poder ser cuantificados. Las fuentes más comunes de enzimas conjugasas (γ -glutamihidrolasa, EC 3.4.22.12) son las provenientes de páncreas de pollo (utilizada preferentemente en el método microbiológico), la proveniente de riñón de cerdo, y las de plasma de humano y rata (Leichter et al., 1979). En el caso del método cromatográfico las enzimas más usadas son las de riñón de cerdo y plasma, ya que van a dar lugar a monoglutamatos como producto final de reacción. La elección de la enzima correcta es, por tanto, esencial para obtener unos resultados óptimos.

Se tomaron 5 ml de extracto de cada una de las muestras analizadas (ajustadas previamente a pH 4,9 debido a que es el óptimo de actuación de la enzima conjugasa) y se les adicionó 1 ml de solución de conjugasa de riñón de cerdo (Gregory et al., 1984). Se les aplica nitrógeno, y posteriormente se introduce en un baño durante 3 horas a 37° C con agitación constante. A continuación, se llevaron a un baño en ebullición durante 5 minutos, con el objetivo de inactivar la actividad enzimática. Pasado ese tiempo las muestras se enfrían en hielo y se pasan a través de filtros de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (filtros desechables Whatman® de nylon con lecho de polipropileno, de 25 mm de diámetro). Posteriormente a la filtración las muestras fueron purificadas para una mejor cuantificación.

Muchos procedimientos de purificación incluyen el intercambio iónico fuerte a través de sílice u otras resinas (Rebello, 1987), de tal forma que los folatos son retenidos en base a sus cargas y recogidos con tampones apropiados o soluciones de elución (Vatheristo et al., 1996). En nuestro caso, fue preciso la preparación de las columnas de afinidad o cartuchos (columnas LiChrolut®, para extracción en fase sólida intercambio fuerte de aniones (SAX), 500 mg). Los cartuchos se lavaron con hexano (2 veces), seguido de metanol, agua Mili-Q y finalmente se hizo pasar la solución de purificación. Se vertieron entonces las muestras en los cartuchos y se pasaron lentamente a través de estos. Antes de que acabaran de pasar las muestras se lavaron las paredes del cartucho con agua Mili-Q. Posteriormente, se les añadió entre 2 y 2.5 ml de solución de elución para ser recogidos en viales previamente pesados. El volumen recogido fue la muestra a cuantificar en HPLC.

Análisis por HPLC

Previo al análisis, se estabilizó el sistema, por lo que se hizo pasar un gradiente de acetonitrilo y tampón potasio fosfato 30 mM, pH 2.2. Las condiciones iniciales del gradiente para la fase móvil fueron 6 % de acetonitrilo y un 94 % de buffer fosfato que se mantuvieron de manera isocrática durante los primeros 6 minutos. Posteriormente la concentración del acetonitrilo fue en aumento lineal hasta un 25 % durante 20 minutos. El tiempo de adquisición de datos fue de 30 minutos y el volumen de inyección fue de 40 µL.

La absorbancia de todos los folatos en elución fue monitorizada por un detector de ultravioleta y uno de fluorescencia. Los folatos analizados se detectan tanto en fluorescencia como en ultravioleta, aunque únicamente fueron detectados por fluorescencia por su mayor sensibilidad, con unos valores de excitación y emisión de 280 nm y 350 nm respectivamente. La identificación de los picos se basó en el tiempo de retención, comparando los picos en fluorescencia y ultravioleta de los patrones con las muestras problema

3.3.9. Determinación de folatos en suero y glóbulos rojos

La determinación tanto de los folatos en suero como en los glóbulos rojos se llevó a cabo a través del Kit DELFIA® Folato. Es un ensayo en fase sólida, fluoroinmunométrico de tiempo resuelto, basado en la reacción de competencia entre el ácido pteroilglutámico (PGA) marcado con europio, la forma estable del folato y el folato de la muestra por un número limitado de sitios de unión en la proteína de unión al folato (PUF). El ensayo presenta una etapa de pretratamiento químico, que tiene por objetivo liberar el folato de las proteínas de transporte y convertirlo en una forma estable y medible. En el ensayo, el anticuerpo de la proteína de unión anti-folato se incubó primero en la placa de microtitulación cubierta con IgG anti-ratón. En una segunda incubación, se añade el trazador de folato marcado con Eu,

la muestra o el estándar de folato y el reactivo de unión del folato (que contiene factor PUF). A continuación el PUF es capturado por el anticuerpo anti-PUF, mientras que el folato marcado y el no marcado compiten por los sitios de unión en la PUF de manera competitiva. La solución intensificadora disocia los iones de europio del folato marcado en una solución donde éstos forman con los componentes de dicha solución quelatos altamente fluorescentes. A continuación, se mide la fluorescencia en cada pocillo. La fluorescencia producida en cada muestra es inversamente proporcional a la concentración en la muestra de folato (Soini y Kojola, 1983; Hemmilä y col., 1984).

Preparación de las muestras

Las muestras de sangre se obtienen después de un periodo de ayunas, puesto que la ingesta reciente de alimentos puede aumentar considerablemente el nivel de folato. Las muestras se obtienen mediante punción venosa (ver sección Material y Métodos). Se puede utilizar el plasma con heparina, no se utiliza aquel que contenga EDTA o citratos debido a sus efectos quelantes sobre el europio. Las muestras de plasma o suero pueden almacenarse durante 24 horas a T^a de 2-8°C. Evitar su exposición a la luz. Para periodos más largos, se congelan a -20°C.

Para medir el folato de los eritrocitos, la sangre puede recogerse en tubos con EDTA o heparina. Es importante determinar el valor del hematocrito. Para su almacenamiento, en periodos de tiempo más largos, la muestra debe hemolizarse y almacenarse como hemolisado congelado durante un máximo de un mes. Para la hemolización, se mezcla 50 µl de cada muestra de sangre y 1 mL de una solución de ácido ascórbico al 0.5%. Se deja reposar durante 90 min. o toda una noche a temperatura ambiente y en la oscuridad. Antes de su utilización se debe añadir a cada muestra 100 µl de la solución BSA.

Material

- Kit pretratamiento de la anemia (Perkin Elmer, Turku, Finlandia)
- Kit DELFIA[®] Folato (Perkin Elmer, Turku, Finlandia)
- Solución de lavado concentrada (Perkin Elmer, Turku, Finlandia)
- Solución intensificadora (Perkin Elmer, Turku, Finlandia)
- Lavador automático
- Agitador automático
- Micropipetas
- Solución BSA (Perkin Elmer, Turku, Finlandia)
- Fluorímetro a tiempo resuelto VICTOR 1420 (PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Turku, Finlandia)

Preparación de los reactivos

1. Reconstituir los estándares de folato, al menos 30 min. antes de utilizarlos (proteger de la luz), cuyas concentraciones fueron: Est. A (0 nmol/L), Est. B (2 nmol/L), Est. C (4 nmol/L), Est. D (10 nmol/L), Est. E (25 nmol/L), Est. F (50 nmol/L).
2. Reconstituir la solución madre de trazador de folato, al menos 30 min. antes de utilizarlo (proteger de la luz)
3. Reconstituir la solución de DTT (Ditiotreitol), al menos 30 min. antes de utilizarla
4. Preparar la solución de liberación (contiene agente de liberación y solución DTT) al menos 30 min. antes de utilizarla
5. Preparar la solución neutralizadora (contiene agente neutralizador y solución DTT) al menos 30 min. antes de utilizarla.
6. Preparar la dilución de trazador Folato-Eu
7. Preparar la dilución de reactivo de unión del folato

Procedimiento

Una vez preparados todos los reactivos, se tomaron 100 µl de cada muestra y de los estándares y se depositaron en viales eppendorf. A continuación se añadió 100 µl de la solución de liberación a cada eppendorf y se dejó reposar durante 15-20 min. en la oscuridad a temperatura ambiente (TA). Durante ese periodo de tiempo, se seleccionaron el número necesario de tiras de microtitulación de la placa y se pipeteó en cada pocillo 200 µl de la solución anti-PUF y se incubó la placa durante 30-40 min a TA en agitación lenta. Posteriormente, se añadió 300 µl de la solución neutralizadora a los viales eppendorf y se incubaron a TA durante 15-30 min. en la oscuridad. Después del proceso de incubación de la placa, se lavaron las tiras en un lavador de placas. Una vez lavada la placa, se añadió a cada pocillo 50 µl de la solución diluida del trazador y 100 µl de los estándares y muestras por duplicado (ver Figura 12).

Posteriormente, se añadió 50 µl de la dilución de reactivo del unión del folato a cada pocillo. Se incubó la placa durante 1h a TA con agitación lenta en el agitador de placas. Después de la incubación, se aspiró y se lavó 6 veces cada tira en el lavador de placas. Una vez lavada la placa se añadió a cada pocillo 200 µl de la solución intensificadora y se incubó durante 5 min. en agitación lenta. Finalizada la incubación se midió la fluorescencia en el fluorímetro a tiempo resuelto. Los resultados obtenidos del fluorímetro fueron expresados en cuentas de fluorescencia y para transformar esos resultados a concentraciones se empleó el programa de cálculo Multicalc® (PerkinElmer. Inc. Turku, Finlandia).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Tira
Est A	Est A	Est B	Est B	Est C	Est C	Est D	Est D	Est E	Est E	Est F	Est F	A
1	1'	2	2'	3	3'	etc.						B
												C
												etc.

Figura 12. Distribución de los estándares y muestras en la placa de titulación

Cálculo de los resultados

Para calcular la concentración de folato eritrocitarios (nmol/L) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Folato eritrocitario (nmol / L)} = \frac{\text{Folato lisado (nmol / L)} \times 23 \times 100}{\text{Hematocrito (\%)}}$$

El factor 23 se deriva de la dilución con ácido ascórbico y la solución BSA (Albúmina Sérica Bovina). Factor de conversión: 1 nmol/L = 0.44 ng/mL.

Validación del ensayo

- Precisión

Se calculó la precisión intra e interensayo (Tabla 19), que fue expresada como coeficientes de variación (CV):

$$CV (\%) = \frac{\text{Desviación Estándar}}{\text{Media}} \times 100$$

- La *precisión intraensayo* se determinó analizando cuatro muestras de plasma de rata, dos con un elevado contenido en folatos y otros dos con bajos contenidos de folatos, seis veces en la misma serie analítica.
- La *precisión interensayo* fue valorada midiendo las mismas muestras empleadas en la precisión intraensayo en tres días diferentes.

Tabla 19. Precisión intra e interensayo de los ensayos por fluorimetría a tiempo resuelto para los folatos.

Muestras	Concentración media folatos (nmol/L)	Intraensayo CV(%) (n=6)	Interensayo CV(%) (n=6)
1	102,856	2,19	9,99
2	102,286	2,15	11,93
3	2,353	10,69	16,11
4	1,570	3,15	16,41

- Exactitud

La exactitud fue valorada por la linealidad bajo dilución de muestras con elevado contenido en folatos tal y como muestra la Figura 13. Para ello se diluyeron de forma seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) en tampón de ensayo DELFIA®, dos muestras que presentaban una elevada concentración de folatos en plasma. Las diferentes diluciones se analizaron y mediante análisis de regresión se comprobó la capacidad del método para determinar de forma lineal y proporcional la cantidad de folatos presente en cada una de las diluciones, representando la concentración de folatos esperada frente a la concentración de folatos obtenida.

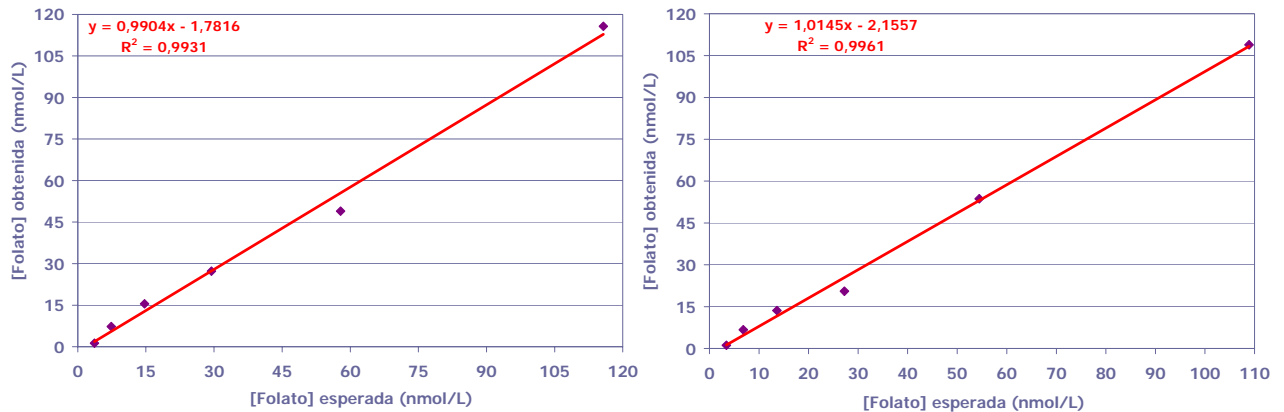


Figura 13. Exactitud de la concentración de folatos valoradas por dilución de dos muestras de plasma de rata con elevado contenido en folato

- Límite de detección

Fue determinado como la mínima concentración de cada muestra de plasma de rata evaluada que puede distinguirse de una muestra de valor cero y se calculó como la media más tres veces la desviación estándar de 12 réplicas del diluyente (Tampón DELFIA®) empleado en los análisis.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el estudio I se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) para comprobar si existían diferencias en la concentración de cada una de las vitaminas presentes en la leche de crecimiento líquida en función del tiempo de almacenamiento y posteriormente en función de la temperatura. En aquellos casos en los que se detectaron diferencias se realizó un análisis de comparaciones múltiple utilizando las pruebas de Tukey y T3 Dunnet. Además, para establecer las relaciones entre el tiempo de almacenamiento o la temperatura y las concentraciones de las vitaminas se realizó un análisis de correlaciones, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson a un nivel de significación de 0.05 y 0.01. Para la determinación de los parámetros cinéticos de degradación de las vitaminas seleccionadas, la velocidad de la reacción se calculó mediante una regresión lineal entre la concentración de las vitaminas y el tiempo de almacenamiento. La energía de activación para cada proceso de deterioro de la vitamina fue calculada utilizando la ecuación de Arrhenius y mediante la regresión lineal entre la inversa de la temperatura y el neperiano de la velocidad de reacción, obteniéndose así el coeficiente de determinación (R^2).

En el estudio II, en los resultados obtenidos por cromatografía sobre la bioaccesibilidad de folatos se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 %, para la determinación de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambas formas de folatos. Además, se empleó el test de Tukey para poder comparar la disponibilidad de los folatos en diferentes lugares del aparato digestivo y a diferentes horas de la digestión.

En el estudio III, se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) para comprobar si existen diferencias en la administración de la leche de crecimiento líquida enriquecida con SF o BF, sobre los parámetros peso corporal inicial y final, ganancia de peso, ingesta total de alimento, parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad del hierro, parámetros hematológicos y bioquímicos y en las concentraciones de hierro en los órganos medidos en los animales, durante el periodo de repleción. En aquellos casos en los que se detectaron diferencias debidas a las anteriores fuentes de variación se realizó un análisis de comparaciones múltiples por parejas utilizando las pruebas de Tukey y T3 Dunnett. En el estudio IV, además se realizó un análisis de varianza multifactorial 2 x 2, donde los efectos principales fueron el tipo de compuesto de hierro (sulfato ferroso y bisglicinato ferroso) y el tipo de compuesto de folato (metafolín y ácido fólico), sobre los parámetros mencionados en el estudio III. Para establecer una relación entre dos o más variables cuantitativas se realizó un análisis de correlación, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson a un nivel de significación de 0,05.

En todos los casos un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo. Los resultados de la presente tesis muestran el valor medio y la desviación típica obtenida de doce ratas por cada tipo de leche de crecimiento enriquecida. El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS para Windows versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

ESTUDIO I

1. ESTABILIDAD DE LAS VITAMINAS EN UNA LECHE DE CRECIMIENTO LÍQUIDA

La leche infantil sufre un tratamiento térmico durante su proceso de fabricación para incrementar su vida útil durante el almacenamiento, pero cuando tiene lugar una esterilización (leche infantil líquida) o cuando se reduce el contenido en agua (leche infantil en polvo), inevitablemente tienen lugar pérdidas de vitaminas y otros nutrientes (Ros y col., 1993). Por lo tanto, las vitaminas son añadidas para compensar las pérdidas y asegurar que la composición de la leche alcance los requerimientos del niño. Para alcanzar una adecuada ingesta de vitaminas, es esencial conocer los niveles de las vitaminas liposolubles e hidrosolubles del producto final.

1.1. Vitaminas hidrosolubles

El contenido de las vitaminas hidrosolubles de la leche de crecimiento infantil analizada y almacenada a 23°, 30° y 37°C, durante un periodo de tiempo de 9 meses se muestra en la Tabla 20.

1.1.1. Efecto de la temperatura y periodo de almacenamiento

El efecto de la concentración de las vitaminas hidrosolubles en el tiempo, se estimó con respecto al contenido de las mismas inmediatamente después de su fabricación (tiempo cero de almacenamiento). El comportamiento de cada una de las diferentes vitaminas hidrosolubles a lo largo del tiempo de almacenamiento siguió patrones muy diferentes. Inmediatamente después de su fabricación y a la T^a de 23°C de almacenamiento, la concentración de las vitaminas B1, B2, B3, B6, B9 y B12 (7,17 µg/Kg, 8,96 mg/Kg, 9,56 mg/Kg, 9,90 mg/Kg, 1,99 µg/Kg y 18 µg/Kg, respectivamente) varió de manera significativa ($p < 0,001$) con respecto a las obtenidas al mes (o 37 días) de almacenamiento. Sin embargo, el contenido de las vitaminas C y B8 se mantuvo constante desde el inicio (13,20 mg/Kg y 185 µg/Kg, respectivamente) hasta el segundo mes de almacenamiento (12,77 mg/Kg y 170 µg/Kg, respectivamente), disminuyendo significativamente ($p < 0,001$) a partir del tercer mes de almacenamiento. Únicamente, la vitamina B5 se mantuvo constante durante los 10 meses de almacenamiento. Se sabe que el ácido pantoténico es la vitamina más estable durante el procesado térmico con valores de pH que oscilan entre 5-7 (Leškova y col., 2006). Además, este hecho coincide con lo expuesto por Fox (1991), el cual observó que en la leche el ácido pantoténico es estable durante la pasteurización.

Las vitaminas B1, B2, B3 y B9 mostraron fluctuaciones a lo largo del tiempo.

1.1.1.1. *Tiamina*. La concentración de tiamina o vitamina B1 en el segundo mes de almacenamiento (8,18 $\mu\text{g/Kg}$) fue significativamente superior ($p < 0,01$) al contenido inicial, descendiendo en el tercer mes (5,68 $\mu\text{g/Kg}$) y aumentando en el cuarto mes de almacenamiento (10,24 $\mu\text{g/Kg}$), para luego descender y alcanzar en el octavo mes valores similares a los del inicio (7,17 $\mu\text{g/Kg}$) (Tabla 20). La vitamina B1, es una vitamina altamente inestable a pH alcalino, su estabilidad depende de la duración del procesado térmico y de las propiedades de la matriz del alimento (Eitenmiller y Landen, 1999). Se ha demostrado que su elevada sensibilidad al calor causa pérdidas durante la pasteurización (Beillot, 2003). Diversos estudios han corroborado las pérdidas de tiamina durante el tratamiento térmico. Göner y Uherová (1980) observaron que un tratamiento UHT y un periodo de almacenamiento de 6 semanas a temperatura ambiente causó un 10% de pérdidas de esta vitamina en la leche. En nuestro caso, las pérdidas que tuvieron lugar durante los primeros 37 días fueron del 11,02% coincidiendo con lo expuesto por ambos autores. En otro estudio, llevado a cabo por Sierra y Vidal-Valverde (2001), observaron que sometiendo la leche entera y desnatada a diferentes temperaturas (90, 110 y 120° C) y con diferentes métodos de calentamiento (microondas y sistemas convencionales) no se producían pérdidas significativas en el contenido de tiamina. En otro estudio, Vidal-Valverde y Redondo (1993) observaron que las pérdidas de tiamina en la leche entera fueron inferiores a la leche desnatada y baja en grasa. Estos resultados fueron atribuidos a que la grasa de la leche protege a la tiamina durante el tratamiento térmico. A pesar de las variaciones en la concentración de la tiamina, ésta alcanzó valores similares tras ocho meses de almacenamiento. No obstante, una explicación a los aumentos de la concentración podría estar causada en el procesado de la muestra a la hora de analizarla.

A los 30°C, la degradación de la tiamina fue menos acusada en comparación con los 23°C, este hecho coincide con los más bajos porcentajes de pérdidas con respecto a los 23°C en cada uno de los periodos de almacenamiento analizados. En general, la tendencia de la concentración de la tiamina fue a disminuir en el tiempo, salvo en algunos periodos de almacenamiento donde la concentración de la misma fue significativamente mayor ($p < 0,05$), como en el cuarto mes (9,72 $\mu\text{g/Kg}$) con respecto al contenido inicial (7,17 $\mu\text{g/Kg}$) (Tabla 20). Ambas variables, concentración de tiamina y tiempo, no estaban correlacionadas entre sí, lo mismo que a los 23°C. Posiblemente, este hecho podría estar relacionado con la falta de homogenización de los ingredientes, lo cual provocaría una distribución del contenido no uniforme. Esto explicaría las elevadas y posteriores disminuciones en las concentraciones de la vitamina a lo largo del tiempo. Al comparar el efecto de la T^a (23°-30°C) sobre la concentración de tiamina, observamos que únicamente hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) a los ocho meses de almacenamiento. Al evaluar la concentración de tiamina a los 37°C durante los diferentes meses de almacenamiento,

observamos que entre el tercer y octavo mes (5,17-6,14 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente) hubo un descenso en la concentración de tiamina en comparación con el contenido inicial (7,17 $\mu\text{g/Kg}$), siendo esta disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En general, el efecto de la temperatura sobre la concentración de tiamina en la leche líquida de crecimiento fue significativo ($p < 0,05$) en la mayoría de los meses de almacenamiento, siendo las mayores pérdidas durante a los 37°C. Destacar, que en el segundo y cuarto mes la concentración de tiamina en las muestras almacenadas a las tres temperaturas obtuvieron cantidades más elevadas y estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en comparación con el contenido inicial. Esto nos podría indicar, lo que anteriormente hemos comentado sobre una alteración en el tratamiento de la muestra a la hora de procesarla.

1.1.1.2. Riboflavina. Hasta el tercer mes de almacenamiento (4,65 mg/Kg) la riboflavina o vitamina B2 fue disminuyendo significativamente ($p < 0,0001$) con respecto al contenido inicial. Sin embargo, entre el cuarto y sexto mes (10,27 y 10,17 mg/Kg, respectivamente) la concentración de riboflavina aumentó, no siendo este aumento estadísticamente significativo con respecto al contenido inicial. Durante el séptimo y noveno mes de almacenamiento (11,31 y 11,10 mg/Kg, respectivamente), la concentración de riboflavina aumentó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al contenido inicial (Tabla 20). Se sabe que la vitamina B2 o riboflavina en la leche es fácilmente destruida en presencia de la luz, y menos sensible al tratamiento térmico que la tiamina (Allen y Parks, 1979). También se ha observado que la pasteurización de la leche provoca pérdidas de hasta un 20% (Thompkinson y Kharb, 2007). Durante el periodo de almacenamiento a la temperatura de 23°C, únicamente se observaron pérdidas durante los primeros tres meses, siendo estas pérdidas del orden del 48%. Estas pérdidas pueden estar relacionadas por el tratamiento térmico de pasteurización al cual fue sometido, ya que su exposición a la luz del sol fue descartada. Además, las pérdidas de riboflavina expuestas a la luz son dependientes de la intensidad de la luz, longitud de onda, tiempo de exposición y el material de envasado (Min y Boff, 2002). Diversos autores han publicado pérdidas de riboflavina expuestas a la luz del sol dependiendo del material de envasado. Según Dunkley y col (1962) las pérdidas de riboflavina en la leche envasada en botella de cristal transparente expuesta a la luz fluorescente variaron de 0,1-0,4 mg/L/h. Satter y deMan (1975), observaron que las pérdidas de riboflavina envasadas en botellas transparentes y en sobrecitos blancos, expuestas a la luz del sol durante un periodo máximo de tiempo de 3 horas, variaban entre un 25-50%. Sin embargo, cuando fue envasada en un envase de cartón y en botellas oscuras, las pérdidas eran significativamente inferiores a los otros envases, siendo las pérdidas del orden del 3-11%. Como se ha comentado anteriormente, la estabilidad de la

riboflavina está afectada por el oxígeno, la actividad del agua y otros componentes tales como los sulfatos de metales o quelatos de aminoácidos (Choe y col., 2005). Cuando la riboflavina fue mezclada con los sulfatos de metales, la riboflavina descendió significativamente ($p < 0,01$) a 37°C durante los 90 a 180 días que duró el periodo de almacenamiento, cuando fue comparada con los quelatos de metales (Marchetti y col., 2000). La riboflavina es relativamente estable bajo las condiciones de cocinado y además es estable en la leche envasada en cartón o botellas oscuras para protegerla de la luz. Según Herreid y Ruskin (1952), las pérdidas de riboflavina podían llegar a ser del orden del 80%, dependiendo del tipo de envase durante su almacenamiento bajo luz o cocinado o de ambos.

A 30°C, la concentración de riboflavina siguió el mismo comportamiento que a 23°C, es decir, tuvo lugar una disminución significativa ($p < 0,0001$) entre el primer y tercer mes de almacenamiento (4,62 y 3,79 mg/Kg, respectivamente) con respecto a la concentración inicial (8,96 mg/Kg). En los meses siguientes la concentración de riboflavina aumentó, pero este aumento no fue significativo hasta el octavo y noveno mes (11,89 y 11,34 mg/Kg, respectivamente) donde hubieron diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al contenido inicial. La misma situación la encontramos a los 37°C (Tabla 20).

En general, en los periodos de tiempo donde hubo una disminución de la concentración de riboflavina (primer y tercer mes) las mayores pérdidas las encontramos a los 37°C.

1.1.1.3. *Niacina*. En el caso de la vitamina B3 o niacina durante el periodo de almacenamiento a 23°C, observamos que desde el primer hasta el quinto mes (12-12,90 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente) aumentó significativamente ($p < 0,001$) con respecto al contenido inicial (9,56 $\mu\text{g/Kg}$). En el sexto mes, la concentración de niacina disminuyó (9,60 $\mu\text{g/Kg}$) alcanzando valores similares al inicio, posteriormente descendió de manera significativa ($p < 0,05$) hasta el octavo mes (7,72 $\mu\text{g/Kg}$), y a los nueve meses la concentración de niacina fue similar al contenido inicial. Las únicas pérdidas que se observaron fueron en el séptimo y octavo mes (10,26 y 19,23%, respectivamente) (Tabla 20). Se observó que cuando la vitamina B1 o tiamina aumenta o disminuye la niacina también lo hace, existiendo una correlación positiva entre ambas vitaminas ($r = 0,492$; $p < 0,05$). A los 30°C, la vitamina B3 mostró un comportamiento muy similar al encontrado a los 23°C. Se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) desde el primer al tercer mes (11,20-12,09 $\mu\text{g/Kg}$), disminuyendo en el cuarto mes (9,45 $\mu\text{g/Kg}$) obteniendo una concentración similar al inicial. En los meses posteriores hubo un aumento en el quinto mes (11,29 $\mu\text{g/Kg}$), para luego descender hasta el noveno mes (7,54 $\mu\text{g/Kg}$). Las pérdidas de la vitamina B3 fueron más acusadas que a los 23°C, variando desde 1,12% en el cuarto mes hasta 40,9% en el octavo mes. Se observó una correlación negativa entre la niacina y la riboflavina ($r = -$

0,712; $p < 0,001$), de manera que cuando una aumenta la otra disminuye a lo largo del tiempo. A los 37°C, la concentración de la vitamina B3 al primer mes (12,39 $\mu\text{g/Kg}$) aumentó significativamente ($p < 0,001$) con respecto al contenido inicial (9,56 $\mu\text{g/Kg}$). No se observó ningún aumento significativo hasta el cuarto mes (15,04 $\mu\text{g/Kg}$), posteriormente entre el sexto y noveno mes (7,61-5,92 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente) la niacina descendió significativamente ($p < 0,001$) con respecto al contenido inicial (Tabla 20).

En general, no se observó ningún efecto de la temperatura en la concentración de la vitamina B3 hasta el cuarto mes de almacenamiento. Sin embargo, a partir del quinto mes las pérdidas de la vitamina B3 fueron más acusadas cuando se almacenaron a la T^a de 37°C, siendo estas pérdidas estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con respecto a otras temperaturas de almacenamiento. A los nueve meses de almacenamiento, que es el periodo de vida útil del producto, únicamente la leche almacenada a los 23°C alcanzó concentraciones de la vitamina B3 similares al contenido inicial, mientras que en las demás temperaturas se observaron pérdidas significativas ($p < 0,001$).

1.1.1.4. Ácido Pantoténico. Con respecto a la vitamina B5 o ácido pantoténico, fue la única vitamina que se mantuvo constante desde su análisis a tiempo cero hasta los nueve meses de almacenamiento (5,50-4,00 mg/Kg, respectivamente) a la T^a 23°C. Esta situación nos confirma que el ácido pantoténico es la vitamina más estable durante el procesado térmico con niveles de pH entre 5-7 (Leškova y col., 2006). Se han observado elevadas pérdidas de esta vitamina durante el cocinado en agua durante la preparación de vegetales. En la leche, el ácido pantoténico es estable durante la pasteurización, ya que el rango normal de la leche se encuentra dentro del rango de pH estable (Fox, 1991). También es resistente a la luz y al aire, pero es sensible a periodos largos de cocinado con agua (Leškova y col., 2006). Durante la T^a de 30°C, la vitamina B5 no sufrió cambios en su concentración durante su periodo de almacenamiento, excepto a los nueve meses (3,50 mg/Kg) donde hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) con respecto al contenido inicial. Por el contrario a la T^a de 37°C, las pérdidas de la vitamina B5 fueron más acusadas a partir del sexto al noveno mes (27,27-45,45%). En general, la vitamina B5 estuvo afectada por la temperatura de almacenamiento, siendo a los 37°C donde hubo mayores pérdidas con respecto a las otras temperaturas de almacenamiento.

Tabla 20. Concentración de las vitaminas hidrosolubles almacenadas a diferentes temperaturas durante un periodo de 9 meses.

T (°C)	Vitamina	Periodo de almacenamiento (meses)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
23°C	C	13,20 ± 0,20	13,02 ± 0,09	12,77 ± 0,12*	12,17 ± 0,15*	11,77 ± 0,23*	11,07 ± 0,15*	10,77 ± 0,31*	10,25 ± 0,37*	9,93 ± ,012*	10,16 ± 0,14*
	B1	7,17 ± 0,27	6,38 ± 0,27*	8,18 ± 0,69*	5,68 ± 0,53*	10,24 ± 0,70*	5,06 ± 0,27*			7,17 ± 0,12	
	B2	8,96 ± 1,06	4,80 ± 1,04*		4,65 ± 1,25*	10,27 ± 0,17	10,74 ± 0,26	10,17 ± 0,40	11,31 ± 0,39*	10,99 ± 0,29*	11,10 ± 0,64*
	B3	9,56 ± 0,19	12,00 ± 1,20*	11,62 ± 1,58*	10,75 ± 0,91*	17,31 ± 0,33*	12,9 ± 0,00*	9,60 ± 0,17	8,58 ± 0,31*	7,72 ± 0,10*	9,28 ± 0,36
	B5	5,50 ± 0,71	5,50 ± 0,71	5,50 ± 0,71	7,00 ± 0,42	6,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
	B6	9,90 ± 0,53	8,16 ± 0,26*	6,08 ± 0,62*	7,09 ± 0,50*	8,83 ± 0,96	9,70 ± 0,68	7,31 ± 0,06*	9,37 ± 0,29	9,17 ± 0,27	6,67 ± 0,24*
	B8	185 ± 7,07	177,5 ± 3,54	170 ± 7,07*	158 ± 4,24*	152,5 ± 3,54*	145 ± 7,07*	147,5 ± 3,54*	145 ± 7,07*	132,5 ± 3,54*	130 ± 0,00*
	B9	1,99 ± 0,23	1,26 ± 0,03*	1,52 ± 0,13*	1,45 ± 0,04*	1,69 ± 0,02*	2,05 ± 0,05	2,29 ± 0,08	1,90 ± 0,03	1,92 ± 0,09	2,00 ± 0,07
	B12	18,00 ± 1,41	9,50 ± 0,71*	5,00 ± 0,00*	4,50 ± 0,71*	4,50 ± 0,71*	4,50 ± 0,71*	4,50 ± 0,71*	4,00 ± 0,00*	3,50 ± 0,71*	3,50 ± 0,71*
	30°C	C	13,20 ± 0,20	12,07 ± 0,08*	11,47 ± 0,38*	11,03 ± 0,15*	10,23 ± 0,25*	9,67 ± 0,21*	8,33 ± 0,15*	8,00 ± 0,16*	6,72 ± 0,13*
B1		7,17 ± 0,27	6,21 ± 0,39*	7,86 ± 0,62	5,84 ± 0,07*	9,72 ± 0,06*	4,65 ± 0,08*			6,71 ± 0,25	
B2		8,96 ± 1,06	4,62 ± 0,19*		3,79 ± 1,19*	10,27 ± 0,24	10,48 ± 0,03	10,44 ± 0,09	10,44 ± 0,18	11,89 ± 0,49*	11,34 ± 0,35*
B3		9,56 ± 0,19	11,20 ± 0,61*	10,86 ± 1,41*	12,09 ± 0,29*	9,45 ± 0,09	11,29 ± 0,00*	8,86 ± 0,04*	8,86 ± 1,19*	5,65 ± 1,13*	7,54 ± 0,16*
B5		5,50 ± 0,71	5,50 ± 0,71	5,00 ± 0,00	7,05 ± 0,07	5,50 ± 0,71	5,00 ± 0,00	4,50 ± 0,71	5,00 ± 0,00	4,50 ± 0,71	3,50 ± 0,71*
B6		9,90 ± 0,53	7,76 ± 0,31*	5,89 ± 0,81*	7,18 ± 0,28*	9,26 ± 0,50	9,42 ± 0,04	6,87 ± 0,42*	8,70 ± 0,89	9,28 ± 0,12	7,92 ± 0,48*
B8		185 ± 7,07	170 ± 7,07*	170 ± 7,07*	165 ± 5,66*	150 ± 0,00*	142,50 ± 3,54*	142,50 ± 3,54*	140 ± 0,00*	135 ± 7,07*	127,50 ± 3,54*
B9		1,99 ± 0,23	1,25 ± 0,07*	1,37 ± 0,07*	1,52 ± 0,03*	1,68 ± 0,01*	1,77 ± 0,04	2,04 ± 0,10	1,72 ± 0,02	1,97 ± 0,12	1,94 ± 0,13
B12		18,00 ± 1,41	8,50 ± 0,71*	5,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	4,50 ± 0,50*	4,50 ± 0,50*	3,50 ± 0,50*	3,00 ± 0,00*	3,00 ± 0,00*
37°C		C	13,20 ± 0,20	11,33 ± 0,15*	10,17 ± 0,31*	9,43 ± 0,21*	8,27 ± 0,21*	7,50 ± 0,30*	6,36 ± 0,10*	5,14 ± 0,34*	
	B1	7,17 ± 0,27	6,84 ± 0,61	7,67 ± 0,29	5,17 ± 0,04*	8,99 ± 0,06*	4,13 ± 0,21*			6,14 ± 0,08*	
	B2	8,96 ± 1,06	3,18 ± 0,94*		2,42 ± 0,19*	9,74 ± 0,14	10,26 ± 0,07	10,06 ± 0,28	10,52 ± 0,09*	11,37 ± 0,37*	10,68 ± 0,52*
	B3	9,56 ± 0,19	12,39 ± 0,27*	9,62 ± 0,50	9,73 ± 3,17	15,04 ± 0,06	9,88 ± 0,00	7,61 ± 0,13*	6,60 ± 0,29*	3,86 ± 0,23*	5,92 ± 0,36*
	B5	5,50 ± 0,71	5,50 ± 0,71	5,00 ± 0,00	6,25 ± 0,35	5,00 ± 0,00	4,50 ± 0,71	4,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	3,00 ± 0,00*
	B6	9,90 ± 0,53	7,57 ± 0,43*	5,57 ± 0,14*	6,57 ± 0,10*	8,87 ± 0,44	9,38 ± 0,07	6,89 ± 0,40*	8,82 ± 0,52	8,87 ± 0,30	7,78 ± 0,38*
	B8	185 ± 7,71	170 ± 7,71*	140 ± 0,00*	140,5 ± 2,12*	132,5 ± 3,54*	110 ± 0,00*	112,5 ± 3,54*	110 ± 0,00*	104 ± 1,41*	105 ± 0,00*
	B9	1,99 ± 0,23	1,35 ± 0,05*	1,16 ± 0,22*	1,32 ± 0,04*	1,66 ± 0,01*	1,71 ± 0,03	1,95 ± 0,03	1,70 ± 0,04	1,87 ± 0,05	1,78 ± 0,10
	B12	18,00 ± 1,41	6,50 ± 0,71*	5,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	3,00 ± 0,00*	2,50 ± 0,71*	2,50 ± 0,71*

*La presencia de asteriscos indican diferencias significativas con respecto al contenido inicial o al tiempo o meses, en cada rango de temperatura.

1.1.1.5. Piridoxina. A 23°C la concentración de Piridoxina o vitamina B6 durante el periodo de almacenamiento fue disminuyendo, siendo esta disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en el primer, segundo, tercer, sexto, y noveno mes (8,16; 6,08; 7,09; 7,31; 6,67 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente) (Tabla 20). En un estudio llevado a cabo por Sierra y Vidal-Valverde (2001) observaron que el tratamiento térmico de la leche entera (3,4% grasa) y desnatada (0,5% grasa) a 90°C produjo pérdidas en la vitamina B6. Este hecho puede estar relacionado con nuestra muestra, con un contenido en grasa del 2,5%, sin embargo otros autores observaron que las pérdidas de la vitamina B6 no dependen del contenido en grasa de la leche (Vidal-Valverde y Redondo, 1993). La misma pauta se observó a las temperaturas de 30° y 37°C, es decir, hubo una disminución significativa ($p < 0,001$) durante los tres primeros meses, luego la concentración se mantuvo en el cuarto y quinto mes, en el sexto mes disminuyó significativamente ($p < 0,05$) para luego aumentar y alcanzar concentraciones similares a la inicial y disminuir de nuevo en el noveno mes. El efecto de la temperatura, únicamente se observó a los nueve meses de almacenamiento, donde las pérdidas de piridoxina fueron significativamente más elevadas ($p < 0,01$) a los 23°C.

1.1.1.6. Ácido Fólico. El contenido de ácido fólico o vitamina B9 a 23°C durante el periodo de almacenamiento disminuyó significativamente ($p < 0,01$) durante los primeros cuatro meses (1,26-1,69 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente) con respecto su contenido inicial (1,99 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Entre el quinto y noveno mes (2,05-2,00 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente) su concentración se mantuvo constante y similar al contenido inicial (Tabla 20). Se sabe que las pérdidas de folatos durante la preparación y el cocinado son el resultado de una combinación de la degradación térmica y la pérdida del mismo por el cocinado en agua (Eitenmiller y Landen, 1999). Las pérdidas del ácido fólico pueden estar influenciadas por factores medioambientales, pH, contenido de oxígeno, concentraciones de iones metálicos, agentes antioxidantes, la duración del procesado y el ratio producto:agua (Keagy, 1985; Hawkes y Villota, 1989; Gregory, 1994). La presencia de agentes reductores, tales como la ácido ascórbico, en el alimento puede incrementar la retención del ácido fólico durante el procesado térmico (Gregory, 1985) y sin embargo la presencia de iones metálicos, como el ión ferroso, puede incrementar las pérdidas (Day y Gregory, 1983; Gregory, 1985). En nuestro caso, la presencia de la vitamina C y de los iones ferrosos del compuesto de hierro, sulfato ferroso, podrían compensar ambas acciones, es decir, la vitamina C actuaría como un agente antioxidante impidiendo la degradación del ácido fólico y sin embargo la presencia del compuesto de hierro ferroso actuaría como prooxidante, degradando el ácido fólico. No obstante, esta vitamina es muy sensible a la luz, a la presencia de oxígeno, y en situaciones que harían disminuir la concentración del ácido fólico durante el procesado y análisis de la misma. Las pérdidas de ácido fólico variaron desde un 36,71% en el primer mes hasta un 3,5% en el octavo mes. A la T^a de 30° y 37°C, la concentración de la vitamina B9 disminuyó

significativamente ($p < 0,01$) durante los primeros cuatro meses con respecto a la concentración de inicio (1,99 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). En los siguientes cinco meses, la concentración de la vitamina B9 se mantuvo constante y muy similar a la concentración de inicio. El efecto de la temperatura tuvo un efecto notable en la concentración de la vitamina B9, encontrando las mayores pérdidas a los 37°C, en el tercer, quinto, sexto, séptimo, y noveno mes (33,6%, 14,20%, 2,16%, 14,88%, 10,69%, respectivamente)

1.1.1.7. Cianocobalamina. La vitamina B12 o cianocobalamina, fue la vitamina que sufrió las mayores pérdidas de todas las vitaminas hidrosolubles. El contenido inicial fue de 18 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y a partir del primer mes de almacenamiento hasta el último mes (9,50-3,50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente) disminuyó significativamente ($p < 0.0001$) con respecto al contenido inicial (Tabla 20). Las pérdidas variaron desde un 47% en el primer mes hasta un 80,56% en el último mes. La vitamina B12 es considerada estable bajo la mayoría de los procesos tecnológicos, pero como todas las vitaminas hidrosolubles, está sujeta a elevadas pérdidas durante el cocinado con agua. La cianocobalamina es el compuesto más importante asociado con la actividad de la vitamina B12, este compuesto sin embargo es degradado tanto por agentes oxidantes como reductores. No obstante, la estabilidad de la vitamina B12 está significativamente influenciada por la presencia de otras vitaminas (Ottaway, 2002). Además, la vitamina B12 es estable durante la pasteurización de la leche, pero un 20% puede perderse durante la esterilización (Ottaway, 2002). La degradación de la vitamina B12 a la Tª de almacenamiento de 30°C durante los periodos de tiempo analizados fueron muy similares a los obtenidos a la Tª de 23°C. Las pérdidas a la Tª de 30°C, variaron desde un 52,8% en el primer mes hasta un 83,33% en el noveno mes. La misma situación la encontramos a la Tª de 37°C, variando las pérdidas entre un 63,9% en el primer mes hasta un 86,10% en el noveno mes.

El resto de las vitaminas analizadas, vitamina C y B8 o biotina, fueron las únicas que mantuvieron una correlación elevada con el tiempo, para cada una de las temperaturas de almacenamiento seleccionadas.

1.1.1.8. Vitamina C. En el caso de la vitamina C y a una Tª de 23°C, la disminución fue significativa ($p < 0,001$) a partir del segundo mes de almacenamiento (12,77 mg/Kg), manteniendo las diferencias ($p < 0,001$) durante el resto del periodo de almacenamiento (Tabla 20). Se sabe que el ácido ascórbico es muy sensible a varios métodos de procesado. Los factores que pueden influir en la naturaleza del mecanismo de degradación incluye la temperatura, concentración de sal y azúcar, pH, oxígeno, enzimas y metales (Priesley, 1979; Steaven, 1988; Steaven y col., 1985; Belitz y col., 1999). El problema de la oxidación del ácido ascórbico durante su almacenamiento es resuelto por la adición de una concentración más elevada antes de su procesado, de manera que el nivel recomendado está presente al

final de su vida comercial. Sin embargo, la degradación de elevadas cantidades de ácido ascórbico en la leche podría tener algunos efectos adversos sobre otros aspectos de la calidad nutricional de la leche (Birlouez-Aragon y col., 2004). En particular, ha sido descrito el papel de los productos de degradación del ácido ascórbico en el desarrollo de la reacción de Maillard (Leclère y col., 2002) y las reacciones con los radicales formados por la mezcla de hierro y ácido ascórbico (Stadman, 1991; Almaas y col., 1997). No obstante, el ácido ascórbico es propenso a la degradación durante el procesado debido a su elevada susceptibilidad a la oxidación en presencia de oxígeno e iones metálicos, y a la degradación durante el tratamiento térmico (Guiguem y Birlouez-Aragon., 2005). Este hecho nos podría confirmar la degradación de la vitamina durante el periodo de almacenamiento, haciendo hincapié en la reactividad con el oxígeno presente en la muestra y la presencia de los iones ferrosos. Un elevado coeficiente de correlación ($r = -0,968$; $p < 0,0001$), entre el periodo de almacenamiento y la concentración del ácido ascórbico, nos indicó una clara degradación de la vitamina C a lo largo del tiempo. Al primer mes de almacenamiento a la temperatura de 30°C la concentración de la vitamina C (12,07 mg/Kg) disminuyó significativamente ($p < 0,0001$) con respecto a su contenido inicial (13,20 mg/Kg). A lo largo de los meses la vitamina C siguió disminuyendo hasta alcanzar una concentración al final del periodo de almacenamiento de 6,26 mg/Kg. Las pérdidas más elevadas se observaron entre el octavo y noveno mes (49-53%, respectivamente). Esta disminución en la concentración de la vitamina C a lo largo del tiempo, se vio reflejada en una correlación inversa entre ambos parámetros ($r = -0,85$; $p < 0,0001$). Cuando se evaluó el comportamiento de la vitamina C almacenada a la temperatura de 37°C durante el periodo de tiempo, observamos al igual que en las anteriores temperaturas, un claro descenso en la concentración de la misma, alcanzando su valor más bajo a los ocho meses (5,14 mg/Kg). Se observó una elevada correlación inversa entre la concentración de la vitamina C y el tiempo ($r = -0,992$; $p < 0,0001$). En general, podemos observar que la temperatura sí afectó a la concentración de la vitamina C, siendo los 37°C donde se mostraron las mayores pérdidas.

1.1.1.9. Biotina. A 23°C la concentración de biotina y al igual que la vitamina C, disminuyó significativamente ($p < 0,001$) a partir del segundo mes de almacenamiento (170 µg/Kg) con respecto al contenido inicial (180 µg/Kg) (Tabla 20). Aunque las pérdidas no fueron muy elevadas, coinciden con las propuestas por Velísek (1999). Este autor sugirió que las pérdidas de la vitamina B8 en una leche pasteurizada variaban entre el 20-30%, coincidiendo con nuestros porcentajes de retención que fueron aproximadamente del orden del 30%. Este mismo autor observó en otros alimentos que el porcentaje de retención de la biotina variaba en un 80% en carnes, 85-90% en leche pasteurizada, 85-95% en legumbres y un 70% en vegetales y frutas. Al igual que la vitamina C, la biotina mostró un elevado coeficiente de correlación ($r = -0,949$; $p < 0,001$), indicando una degradación de la misma a lo

largo del periodo de almacenamiento. A los 30° y 37°C, la concentración de biotina descendió significativamente ($p < 0,0001$) desde el primer al noveno mes (170-127,50 y 170-105 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente). Esta disminución estuvo correlacionada con el tiempo, siendo para los 30°C ($r = - 0,952$; $p < 0,0001$) y para los 37°C ($r = - 0,921$; $p < 0,0001$).

1.2. Vitaminas liposolubles

El contenido de las vitaminas liposolubles de la leche de crecimiento infantil analizada y almacenada a 23°, 30° y 37°C, durante un periodo de tiempo de 9 meses son mostradas en la Tabla 21.

1.2.1. Efecto de la temperatura y periodo de almacenamiento

El efecto de la concentración de las vitaminas liposolubles en el tiempo, fue estimado con respecto al contenido de las mismas inmediatamente después de su fabricación (tiempo cero de almacenamiento). El comportamiento de las diferentes vitaminas liposolubles a lo largo del tiempo de almacenamiento y a diferentes temperaturas siguieron patrones muy similares.

1.2.1.1. Vitamina A. La concentración inicial de la vitamina A inmediatamente después de la fabricación de la leche de crecimiento líquida fue de 3,10 mg/Kg. Durante la temperatura de almacenamiento de 23°C, la concentración de la vitamina A se mantuvo constante durante los dos primeros meses, con respecto al contenido inicial. A partir del tercer mes (2,55 mg/Kg) y hasta el noveno mes (1,75 mg/Kg) la concentración de la vitamina A descendió significativamente ($p < 0,005$) respecto al valor inicial (3,10 mg/Kg) (Tabla 21). La relación entre la concentración de la vitamina A y el tiempo se ve reflejada en la elevada correlación entre ambas variables ($r = - 0,973$; $p < 0,0001$). Las pérdidas de la vitamina A fueron de menos a más, es decir, en el primer mes estas fueron del orden del 6,5% hasta el último mes que fueron del 43,55%. Una situación muy parecida la encontramos durante el almacenamiento a 30 y 37°C. En este caso, la disminución de la concentración de la vitamina A tuvo lugar a partir del primer mes (2,85 mg/Kg a los 30°C y 37°C). La tendencia de la concentración de la vitamina A en ambas temperaturas de almacenamiento fue a disminuir en el tiempo, alcanzando valores en el último mes para los 30°C de 1,50 mg/Kg y para los 37°C de 1,05 mg/Kg. Las pérdidas fueron más elevadas que a la temperatura de 23°C, siendo en el último mes de almacenamiento para los 30°C del orden del 52% y para los 37°C del 66% (Tabla 21). En concreto, las pérdidas que tienen lugar a los 37°C coinciden con los obtenidos por Woollard y Fairweather (1985), los cuales documentaron pérdidas de vitamina A del orden del 60% en muestras de leches UHT enriquecidas y almacenadas durante 7 meses a 35°C. También se observó una correlación inversa entre la concentración de la vitamina A y el tiempo, siendo de $r = - 0,966$; $p < 0,0001$ a la Tª de 30°C y $r = - 0,956$;

$p < 0,0001$ a los 37°C . En general, la concentración de la vitamina A presente en la leche líquida de crecimiento se vio afectada por la temperatura de almacenamiento, siendo la pauta de degradación: $37^{\circ} > 30^{\circ} > 23^{\circ}\text{C}$. La vitamina A es bastante estable bajo una atmósfera inerte, pero rápidamente pierde su actividad cuando es calentada en presencia de oxígeno, especialmente a elevadas temperaturas (Leškova y col., 2006). Bilic y Sieber (1988), observaron que no hubo efecto de la pasteurización a $75-90^{\circ}\text{C}$ en el contenido de la vitamina A entre la leche cruda, pasteurizada y cocinada. En nuestro caso no fue la temperatura de pasteurización la causa de la disminución en la concentración de la vitamina A, sino la temperatura de almacenamiento el posible factor que desencadenó la reacción de degradación.

Una explicación a estas elevadas pérdidas de la vitamina A la encontramos en el posible efecto protector de la grasa (Lau y col., 1986; Vidal-Valverde y col., 1992). Otros autores como Le Moguer y Jackson (1983) y Woollard y Fairweather (1985) observaron que en una leche UHT con un porcentaje de grasa del 2% las pérdidas de la vitamina A almacenada durante tres meses a 37°C variaban entre el 13,7-38,5% y aproximadamente del orden del 60% cuando fueron almacenadas durante 7 meses. Esto explicaría porque otras leches infantiles con un bajo contenido en grasa (2,9%), almacenadas durante un periodo de 12 meses, mostraban mayores pérdidas en la vitamina A (22% a 20°C , 42% a 30°C y 63% a 37°C) (Albalá-Hurtado y col., 2000b). Otro posible factor que podría explicar las diferencias en la estabilidad de la vitamina A es la cantidad de oxígeno molecular en la matriz del alimento y en el espacio de cabeza del envase (Le Moguer y Jackson, 1983; McCarthy y col., 1986). Otro factor a tener en cuenta es la presencia de ciertas vitaminas tales como la B1, B6, B12, C y D que podría retardar la degradación de la vitamina A. Además, estas vitaminas podrían disminuir el contacto de la vitamina A con los radicales libres (Kim y col., 2000). En un estudio llevado a cabo por Bourdonnais (1994), se demostró que el quelato de hierro-aminoácido no aceleró significativamente la degradación del palmitato de retinol. Este hecho está relacionado por la susceptibilidad de la mayoría de las vitaminas a la oxidación, ya que la presencia en el mismo alimento de compuestos de hierro solubles favorecería la aceleración de la degradación de las vitaminas, debido al efecto catalítico que tiene el hierro (Levander y Cheng, 1980; Lonnerdal, 1988; Bourdonnais, 1994). Los compuestos de hierro insolubles o poco insolubles tienden a reaccionar más lentamente con las vitaminas y en algunos casos, no reaccionan. Sin embargo, la falta de solubilidad de los compuestos de hierro generaría una baja biodisponibilidad (Allen, 1998). Por el contrario, los compuestos de hierro solubles destruirían las vitaminas esenciales presentes en el alimento (Marchetti y col., 2000).

Tabla 21. Concentración de las vitaminas liposolubles almacenadas a diferentes temperaturas durante un periodo de 9 meses.

T (°C)	Vitamina	Periodo de almacenamiento (meses o días)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
23°C	A	3,10 ± 0,00	2,9 ± 0,00	2,95 ± 0,07	2,55 ± 0,07*	2,55 ± 0,07*	2,55 ± 0,07*	2,20 ± 0,14*	2,15 ± 0,07*	2,00 ± 0,00*	1,75 ± 0,07*
	D	31,50 ± 2,12	32,00 ± 1,41	33,00 ± 0,00	27,50 ± 0,71*	24,00 ± 0,00*	24,50 ± 0,71*	24,50 ± 0,71*	25,00 ± 0,00*	22,50 ± 0,71*	22,00 ± 1,41*
	E	16,85 ± 0,78	16,75 ± 0,07	16,35 ± 0,07	14,15 ± 0,21*	14,15 ± 0,07*	14,15 ± 0,07*	13,40 ± 0,14*	13,35 ± 0,21*	12,95 ± 0,07*	12,90 ± 0,14*
30°C	A	3,10 ± 0,00	2,85 ± 0,07*	2,50 ± 0,00*	2,35 ± 0,07*	2,35 ± 0,07*	2,20 ± 0,00*	2,00 ± 0,00*	1,75 ± 0,07*	1,50 ± 0,00*	1,50 ± 0,00*
	D	31,50 ± 2,12	32,00 ± 0,00	28,00 ± 1,41*	27,00 ± 0,00*	24,00 ± 0,00*	23,50 ± 0,71*	23,50 ± 0,71*	23,00 ± 1,41*	21,00 ± 0,00*	20,00 ± 0,00*
	E	16,85 ± 0,78	16,60 ± 0,14	15,20 ± 0,00*	14,20 ± 0,14*	14,20 ± 0,28*	14,10 ± 0,14*	12,30 ± 0,14*	12,25 ± 0,21*	12,05 ± 0,07*	12,00 ± 0,00*
37°C	A	3,10 ± 0,00	2,85 ± 0,07*	2,30 ± 0,00*	2,00 ± 0,00*	1,85 ± 0,07*	1,80 ± 0,00*	1,60 ± 0,00*	1,50 ± 0,00*	1,10 ± 0,14*	1,05 ± 0,21*
	D	31,50 ± 2,12	32,00 ± 0,00	27,50 ± 0,71*	26,00 ± 1,41*	22,50 ± 0,71*	21,50 ± 0,71*	22,50 ± 0,71*	22,00 ± 0,00*	20,00 ± 0,00*	18,50 ± 0,71*
	E	16,85 ± 0,78	16,55 ± 0,07	15,30 ± 0,14*	13,95 ± 0,21*	13,85 ± 0,07*	13,80 ± 0,00*	11,80 ± 0,00*	11,80 ± 0,14*	11,15 ± 0,07*	10,95 ± 0,07*

La presencia de asteriscos indican diferencias significativas con respecto al contenido inicial o al tiempo o meses, en cada rango de temperatura.

1.2.1.2. Vitamina D. La concentración de la vitamina D inmediatamente después de la elaboración de la leche líquida de crecimiento fue de 31,50 µg/Kg. Durante su almacenamiento a 23°C, la concentración de la vitamina D se mantuvo estable durante los dos primeros meses, sin embargo a partir del tercer mes (27,50 µg/Kg) y hasta el noveno mes (22 µg/Kg) la concentración disminuyó significativamente ($p < 0,0005$) (Tabla 21). Esta disminución estuvo correlacionada con el tiempo ($r = - 0,925$; $p < 0,0001$). Las pérdidas de la vitamina D variaron desde un 12,70% en el tercer mes hasta un 30,16% en el noveno mes. Cuando se almacenó a la temperatura de 30°C, la concentración de la vitamina D disminuyó significativamente ($p < 0,0005$) desde el segundo mes (28 µg/Kg) hasta el noveno mes (20 µg/Kg) con respecto a su contenido inicial. Durante esta temperatura las pérdidas fueron ligeramente más elevadas que a los 23°C, variando desde el 11,11% en el segundo mes hasta el 36,50% en el noveno mes. La concentración de la vitamina D durante la temperatura de almacenamiento de 37°C siguió la misma pauta que a la Tª de 30°C. A partir del segundo mes (27,50 µg/Kg) la concentración de la vitamina D disminuyó significativamente ($p < 0,0005$) con respecto su contenido inicial. En este caso, las pérdidas fueron muy similares durante los primeros tres meses, a partir del cuarto mes las pérdidas fueron significativamente más elevadas ($p < 0,05$) que en las temperaturas anteriores. Las pérdidas variaron entre 12,70-41,27%. También se observó una elevada correlación inversa entre el tiempo de almacenamiento y la concentración de la vitamina D, siendo a los 30°C ($r = - 0,947$; $p < 0,0001$) y a los 37°C ($r = - 0,936$; $p < 0,0001$). El efecto de la temperatura sobre la inestabilidad de la vitamina D se observó a los 37°C, donde se produjeron las mayores pérdidas de la misma. Se sabe que la vitamina D es susceptible a un rango de pH alcalino, a la luz y al calor (Bolin, 1982; Harris, 1987). En un estudio realizado por Davídek y col (1993), se observó que durante la pasteurización y la esterilización de la leche no se encontraron pérdidas de vitamina D. Además, la exposición al aire no afectó a la estabilidad de la vitamina D en la leche, pero que sin embargo algunas pérdidas se observaron cuando fue expuesto a la luz (Renken y Warthesen, 1993). Sin embargo, el contenido en grasa probablemente sea un factor a tener en cuenta, el cual puede afectar a la retención de la vitamina D durante el tratamiento térmico. Un elevado contenido en grasa generalmente resulta en un elevado porcentaje de pérdidas debido al goteo, mientras que un contenido bajo en grasa podría afectar al aislamiento térmico y la vitamina D sea más fácilmente accesible a otros factores, como la luz (Lešková y col., 2006).

1.2.1.3. Vitamina E. La concentración de la vitamina E inmediatamente después de la elaboración de la leche fue de 16,85 mg/Kg. A los 23°C la vitamina E se mantuvo estable durante los dos primeros meses, mientras que a partir del tercer mes (14,15 mg/Kg) hasta el noveno mes (12,90 mg/Kg) la concentración de la vitamina E disminuyó significativamente ($p < 0,0005$) (Tabla 21). Se establece por tanto una correlación inversa entre la concentración

de la vitamina E y el periodo de almacenamiento ($r = - 0,933$; $p < 0,0001$). Las pérdidas variaron desde 16% en el tercer mes hasta un 23,44% en el noveno mes. El comportamiento de la vitamina E cuando se almacenó a las T^a de 30 y 37°C fueron muy similares. Durante el primer mes, la concentración de la vitamina E a ambas T^a (30 y 37°C) fue estable con respecto al contenido inicial. A partir del segundo mes (15,20 mg/Kg a 30°C y 15,30 mg/Kg a 37°C) hasta el noveno mes de almacenamiento (12 mg/Kg a 30°C y 10,95 mg/Kg a 37°C) la concentración de la vitamina E disminuyó significativamente ($p < 0,0005$) con respecto al contenido inicial. Se observó que a las temperaturas de 30 y 37°C, la concentración de la vitamina E disminuye a medida que aumenta el tiempo, estableciéndose una correlación inversa entre ambas variables, siendo a los 30°C ($r = - 0,950$; $p < 0,0001$) y para los 37°C ($r = -0,967$; $p < 0,0001$). Las formulas infantiles contienen tocoferoles derivados de aceites vegetales usados como ingredientes (Renner, 1989) y de la adición específica de α -tocoferol o acetato de tocoferol durante la fabricación. En relación a su estabilidad, cuando se exponen a la luz y al aire, el α -tocoferol es el más forma más frecuentemente usada de la vitamina (Ball, 1996). La estabilidad de los tocoferoles puede estar afectada por factores medioambientales tales como la luz, oxígeno y la temperatura, además de los factores relacionados con el alimento como la humedad (Piironen y col., 1988), actividad del agua (Vidal-Valverde y col., 1993), oxidación lipídica (Kamal-Eldin y col., 2002), medio alcalino y pequeñas cantidades de metales de transición (Cort y col., 1978). La influencia de las distintas condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de los tocoferoles en formulas infantiles y productos relacionados han sido evaluadas: α -tocoferol en leche UHT (Vidal-Valverde y col., 1993), vitamina E en formulas infantiles (Albalá-Hurtado y col., 2000b c).

1.3. Estudio cinético de degradación de las vitaminas

1.3.1. Vitamina C

La pérdida de vitamina C en la leche de crecimiento líquida siguió un modelo cinético de primer orden en todas las temperaturas. Este modelo está en relación con otros estudios (Lathrop y Leung, 1980; Johnson y col., 1995; Lee y Coates, 1999). Por otro lado, se han descrito otros modelos para la degradación de la vitamina C como una cinética de orden cero (Laing y col., 1978) o una cinética de orden dos (Robertson y Samaniego, 1986). En las Figuras 14 y 15 se representan la degradación de la vitamina C en la leche líquida de crecimiento a las diferentes temperaturas (23, 30 y 37°C), siguiendo modelos cinéticos tanto de orden uno como de orden cero, respectivamente. Los coeficientes de correlación para una cinética de orden cero fueron similares a los obtenidos para la cinética de orden uno. Un coeficiente de correlación $> 0,9$ en todos los casos, confirma que la degradación de la vitamina C siguió una cinética de primer orden, sin embargo la cinética de orden cero mostró coeficientes $> 0,9$.

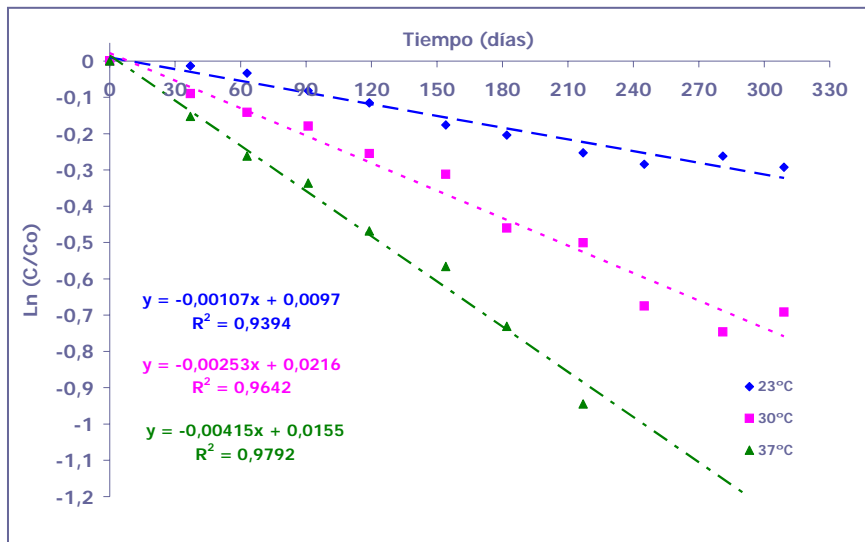


Figura 14. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina C en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

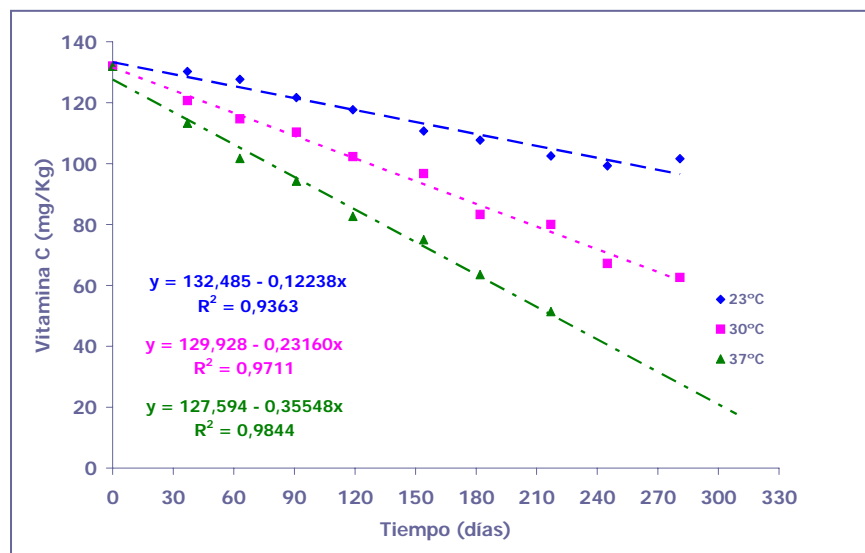


Figura 15. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina C en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

En la Tabla 22, se muestra la constante de velocidad tanto para una cinética de orden uno como de orden cero y la vida media de la vitamina C en la leche de crecimiento para cada una de las temperaturas. El tiempo requerido para que la vitamina C se degrade al 50% de su contenido inicial, $t_{1/2}$, fue calculado de la constante de la velocidad como $0,693/K$. Partiendo de la ecuación de primer orden: $C_t = C_o * e^{-Kt}$ y asumiendo que $C_t = C_o/2$, para luego aplicar logaritmos neperianos a ambos lados de la ecuación, obtendríamos que $t_{1/2} = \ln 2/K$. Para una cinética de orden cero el tiempo requerido para que la vitamina C se degrade al 50% de su contenido inicial, sería $t_{1/2} = 0,5C_o/K$.

Las constantes de velocidad para la degradación de la vitamina C para una cinética de orden uno en la leche de crecimiento aumentaron de $1,08 \times 10^{-3}$ días para la temperatura de 23°C a $4,15 \times 10^{-3}$ días para la temperatura de 37°C, y el periodo de vida medio descendió de 645,4 días a 167 días como consecuencia del incremento de la temperatura de 23 a 37°C.

Tabla 22. Constante de la velocidad^a (*K*), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina C y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.

T (°C)	Vitamina C					
	Cinética de orden uno			Cinética de orden cero		
	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (días ⁻¹)	R ²	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (mg/Kg días)	R ²
23	645,39	1,08 x 10 ⁻³	0,94	539	0,1224	0,94
30	273,97	2,53 x 10 ⁻³	0,96	284,9	0,2317	0,97
37	167,02	4,15 x 10 ⁻³	0,98	186	0,3554	0,98

^aEl error típico en los valores de *K* fueron inferiores a 5 x 10⁻⁵

En el caso de una cinética de orden cero, las constantes de velocidad fueron más altas para cada una de las temperaturas comparadas con la cinética de orden uno, aumentando de 0,1224 para los 23°C a 0,3554 para los 37°C, este aumento estuvo correlacionado con la disminución de la vida media de la concentración de la vitamina C, variando de 539 a 186 días como consecuencia del aumento de la temperatura.

El efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la degradación de la vitamina C fue determinada por la ecuación de Arrhenius:

$$K = K_0 * e^{-E_a/RT}$$

donde *K* es la constante de la velocidad; *K*₀ es el factor pre-exponencial; *E*_a es la energía de activación (Kcal mol⁻¹); *R* es la constante de los gases (1,987 Kcal mol⁻¹ K⁻¹); *T* es la temperatura absoluta en °K. Las energías de activación *E*_a, fueron calculadas como el producto de la constante de los gases *R*, y la pendiente del gráfico obtenido de la representación del ln *K* frente a la inversa de la temperatura 1/*T*. En la Figura 16, se representa la ecuación de Arrhenius para la degradación de la vitamina C en la leche de crecimiento en un modelo cinético de orden uno y cero, respectivamente.

La energía de activación fue para el modelo cinético de orden uno de 17,64 Kcal mol⁻¹, y para el modelo cinético de orden cero fue de 13,91 Kcal mol⁻¹, ambos con un coeficiente de correlación de R²= 0,99. Ambos modelos se ajustan satisfactoriamente a los resultados obtenidos, pero sin embargo siguiendo las pautas marcadas por la mayoría de los autores, a la degradación de la vitamina C siguió una cinética de orden uno. Diferentes estudios han documentado una amplia variación en la energía de activación para la degradación de la vitamina C en diferentes alimentos. La energía de activación en guisantes en conserva mostró una energía de activación de 41 Kcal mol⁻¹ (Lathrop y Leung, 1980). La energía de activación en patatas almacenados a diferentes temperaturas (4, 8, 12, 16 y 20°C) fue de 23,58 Kcal mol⁻¹ (Nourian y col., 2003). Alvarado y Viteri (1989), determinaron la energía de activación de varios zumos de frutas cítricas a diferentes temperaturas (20-92°C) que variaron de 10,66 Kcal mol⁻¹ para el zumo de mandarina hasta 13,89 Kcal mol⁻¹ para el zumo de lima. Vieira y col. (2000), determinaron la energía de activación para el néctar de cupuaçu a diferentes temperaturas (60, 70, 75, 80, 90, y 99°C) siendo del orden de 17,69

Kcal mol⁻¹. La diferencia en la energía de activación con respecto a los obtenidos en los diferentes estudios, puede ser debido a los diferentes rangos de temperatura de nuestro estudio y a las diferentes condiciones medioambientales, tales como el oxígeno, humedad, pH y por supuesto la composición de los alimentos.

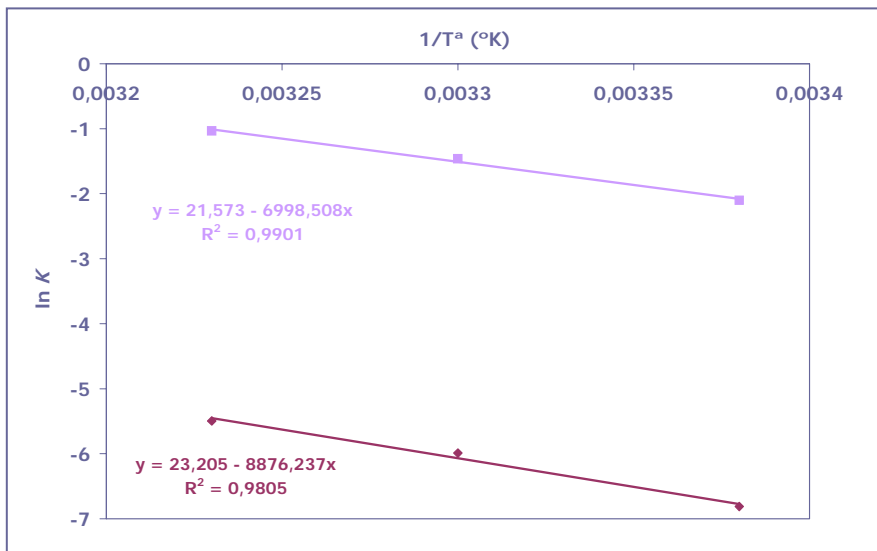


Figura 16. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina C en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida

En general, sustituyendo en la ecuación cinética tanto de orden uno como de orden cero el valor de K por la ecuación de Arrhenius, obtendríamos una ecuación general que nos podría predecir la concentración de la vitamina C a un tiempo dado, tal y como la fecha de caducidad del producto, y a una temperatura de almacenamiento determinada. Por tanto, las ecuaciones quedarían de la siguiente manera:

Orden uno

$$\text{Vit C} = 132 \times e^{(-1,20 \cdot 10 \cdot \text{Exp}10 \times t \times e \cdot \text{Exp}(-8876,2/T))}$$

Orden cero

$$\text{Vit C} = 132 - 2,34 \times 10^6 \times t \times e^{(-6998,5/T)}$$

Además, dado que hay un efecto entre el tiempo de almacenamiento, la concentración de la vitamina C y la temperatura, podríamos cuantificar esta relación mediante una aproximación lineal a través de una regresión. De este modo la ecuación sería la siguiente:

$$\text{Vit C} = 868,555 - 0,207 t - 2,445 T$$

De acuerdo con esta ecuación, la concentración de la vitamina C disminuiría a un velocidad de 0,207 mg/ día con un error típico de 0,001, y 2.445 mg/T con un error típico de 0,016.

1.3.2. Vitamina B8

El contenido de la vitamina B8 o Biotina en la leche líquida de crecimiento durante el tiempo de almacenamiento siguió un modelo cinético tanto de orden cero como de primer

orden en todas las temperaturas. Los coeficientes de correlación, muy similares entre sí, no nos permite definir con exactitud que tipo de cinética presentó. Probablemente si se alargara el periodo de almacenamiento o se establecieran otras temperaturas nos permitiría ver que tipo de cinética sigue.

En las Figuras 17 y 18 se representan la degradación de la vitamina B8 en la leche líquida de crecimiento a las diferentes temperaturas (23, 30 y 37°C), siguiendo modelos cinéticos tanto de orden uno como de orden cero, respectivamente. Los coeficientes de correlación para una cinética de orden cero fueron similares a los obtenidos para la cinética de orden uno. Un coeficiente de correlación > 0,9 en casi todos los casos, confirma que la degradación de la vitamina B8 siguió una cinética de primer orden, sin embargo la cinética de orden cero mostró coeficientes > 0,9, salvo a los 37°C.

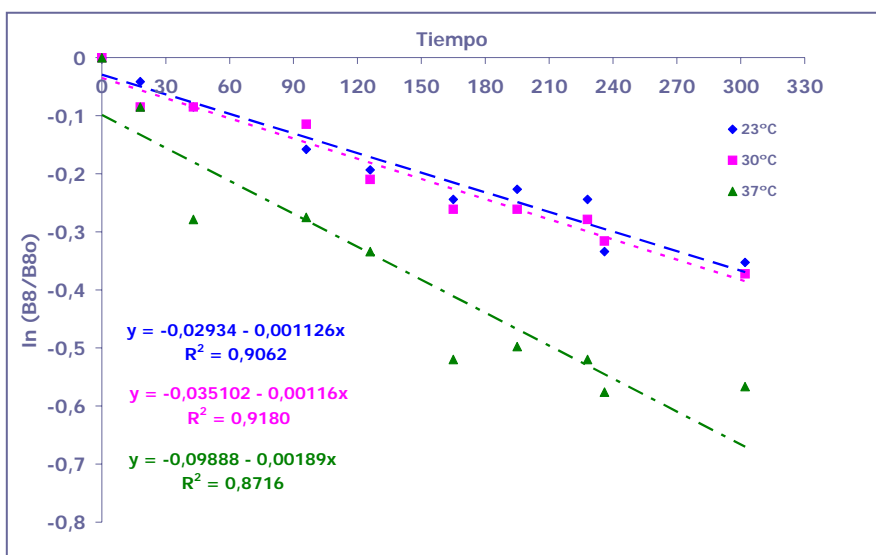


Figura 17. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina B8 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

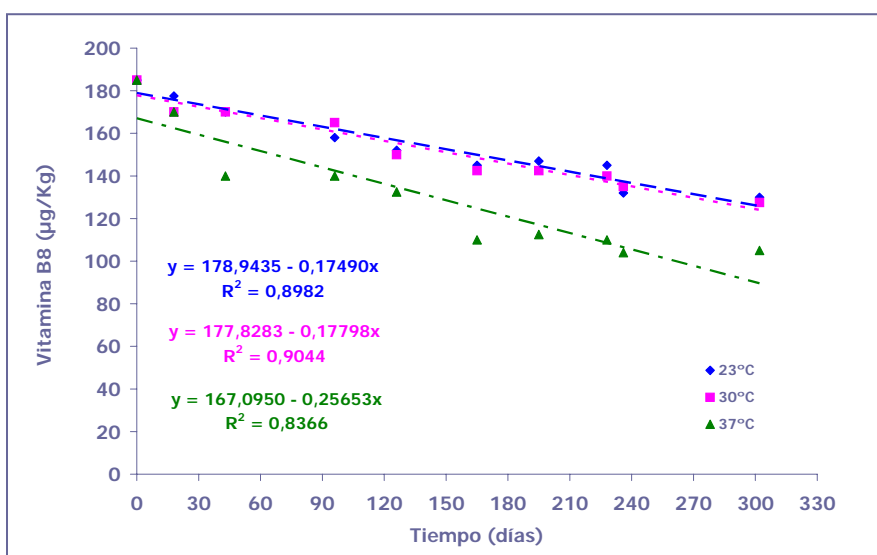


Figura 18. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina B8 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.

En la Tabla 23, se muestra la constante de velocidad tanto para una cinética de orden uno como de orden cero y la vida media de la vitamina B8 en la leche de crecimiento para cada una de las temperaturas.

Tabla 23. Constante de la velocidad^a (*K*), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina B8 y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.

T (°C)	Vitamina C					
	Cinética de orden uno			Cinética de orden cero		
	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (días ⁻¹)	R ²	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (mg/Kg días)	R ²
23	615,56	1,12 x 10 ⁻³	0,91	529	0,1749	0,90
30	598,07	1,16 x 10 ⁻³	0,92	519,66	0,1780	0,90
37	366,50	1,89 x 10 ⁻³	0,87	361	0,2565	0,84

^aEl error típico en los valores de *K* fueron inferiores a 5 x 10⁻⁵

Las constantes de velocidad para la degradación de la vitamina B8 para una cinética de orden uno en la leche de crecimiento aumentaron de 1,12 x 10⁻³ días para la temperatura de 23°C a 1,89 x 10⁻³ días para la temperatura de 37°C, y el periodo de vida medio descendió de 615,6 días a 366,50 días como consecuencia del incremento de la temperatura de 23 a 37°C. En el caso de una cinética de orden cero, las constantes de velocidad fueron unas 100 veces más altas para cada una de las temperaturas comparadas con la cinética de orden uno, aumentando de 0,1749 para los 23°C a 0,2565 para los 37°C, este aumento estuvo correlacionado con la disminución de la vida media de la concentración de la vitamina B8, variando de 529 a 361 días como consecuencia del aumento de la temperatura.

En la Figura 19, se representan la ecuación de Arrhenius para la degradación de la vitamina B8 en la leche de crecimiento en un modelo cinético de orden uno y cero, respectivamente.

La energía de activación para el modelo cinético de orden uno fue de 6,71 Kcal mol⁻¹, y para el modelo cinético de orden cero de 4,95 Kcal mol⁻¹, ambos con un coeficiente de correlación de R²= 0,78 y R²= 0,77, respectivamente. La energía de activación nos indica en cierta manera cómo de rápido es la velocidad de la reacción. En este caso, la energía de activación para la cinética de orden cero fue inferior a la obtenida por la cinética de orden uno, indicando que la degradación de la biotina siguiendo una cinética de orden cero es mucho mayor que si sigue una cinética de orden uno.

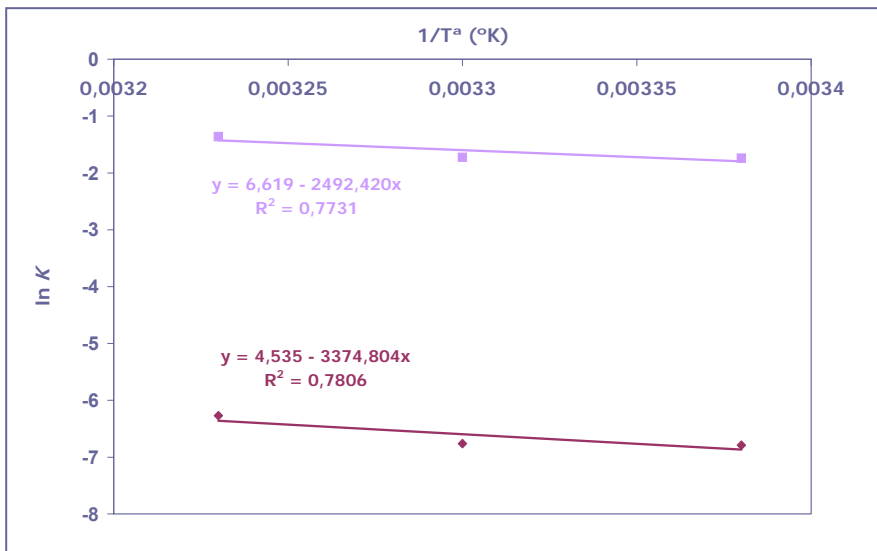


Figura 19. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina B8 en un modelo cinético de orden uno (♦) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.

En general, sustituyendo en la ecuación cinética tanto de orden uno como de orden cero el valor de K por la ecuación de Arrhenius, obtendríamos una ecuación general que nos podría predecir la concentración de la vitamina B8 a un tiempo dado, como la fecha de caducidad del producto, y a una temperatura de almacenamiento determinada. Por tanto, las ecuaciones quedarían de la siguiente manera:

Orden uno

$$\text{Vit B8} = 185 \times e^{(-93,224 \times t \times e^{\text{Exp}(-3374,8/T)})}$$

Orden cero

$$\text{Vit B8} = 185 - 749,196 \times t \times e^{(-2492,4/T)}$$

Además, dado que hay un efecto entre el tiempo de almacenamiento, la concentración de la vitamina B8 y la temperatura, podríamos cuantificar esta relación mediante una aproximación lineal a través de una regresión. De este modo la ecuación sería la siguiente:

$$\text{Vit B8} = 679,983 - 1,668 t - 0,203 T \quad (R^2 = 0,83)$$

De acuerdo con esta ecuación, la concentración de la vitamina B8 disminuiría a un velocidad de 1,668 µg/ día con un error típico de 0,014, y 0,203 µg /T con un error típico de 0,228.

1.3.3. Vitamina A

Las pérdidas de la vitamina A en la leche líquida de crecimiento siguió un modelo cinético de primer orden en todas las temperaturas, sin embargo los coeficientes de determinación tanto para la cinética de primer orden como de orden cero fueron muy similares. En las Figuras 20 y 21, se representan la relación entre la degradación de la concentración de la vitamina A frente al tiempo de almacenamiento, expresado en días.

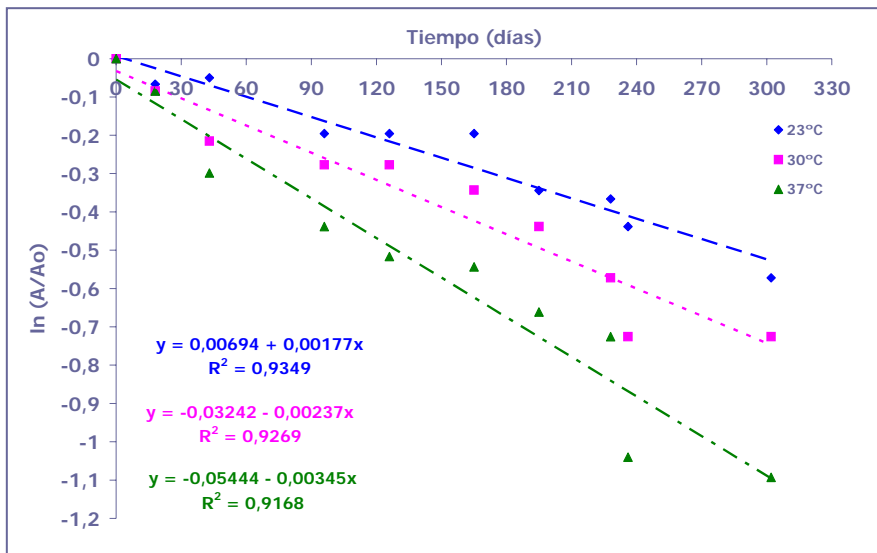


Figura 20. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina A en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

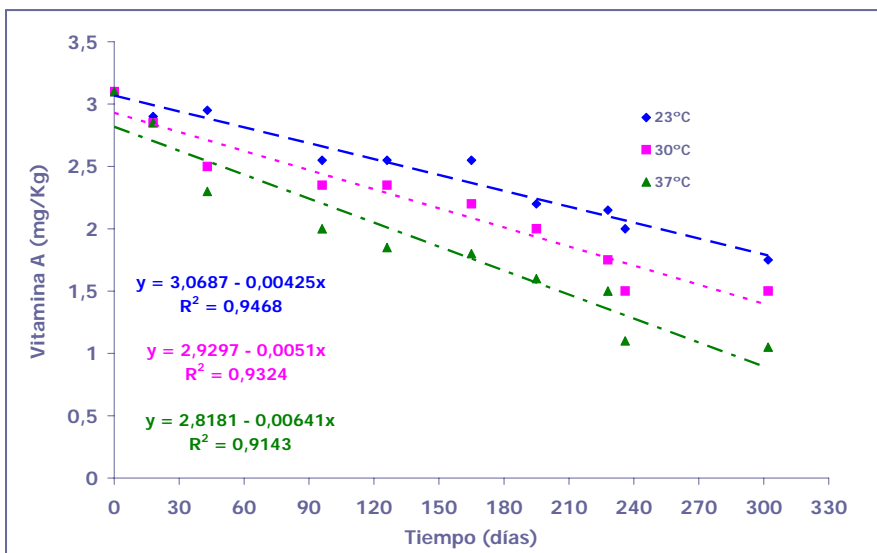


Figura 21. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina A en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

La leche de crecimiento mostró un R^2 para la reacción de orden uno de 0,93 para la temperatura de 23°C, mientras que para la reacción de orden cero fue de 0,95. La misma situación se mostró para las demás temperaturas, siendo los coeficientes de determinación para las reacciones de orden uno muy similares a los de orden cero. Ambos coeficientes de determinación fueron prácticamente idénticos, y con los escasos datos disponibles en la bibliografía, no es posible asegurar si las pérdidas de la vitamina A siguen una ecuación cinética de orden uno o cero, por tanto sería necesario aumentar el tiempo o las temperaturas de almacenamiento. No obstante, algunos autores determinaron que las pérdidas de la vitamina A durante su almacenamiento siguió una ecuación cinética de orden uno (Sigh, 1994; Albalá-Hurtado y col., 2000b). Por lo tanto, nosotros presuponemos que las pérdidas de la vitamina A en la leche líquida de crecimiento siguió una cinética de orden uno, al menos durante el intervalo de tiempo y el rango de la concentración obtenida.

En la Tabla 24, se muestra la constante de velocidad tanto para una cinética de orden uno como de orden cero y la vida media de la vitamina A en la leche de crecimiento para cada una de las temperaturas.

Tabla 24. Constante de la velocidad^a (*K*), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina A y los coeficientes en una formula líquida de crecimiento.

T (°C)	Vitamina A					
	Cinética de orden uno			Cinética de orden cero		
	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (días ⁻¹)	R ²	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (mg/Kg días)	R ²
23	391,76	1,77 x 10 ⁻³	0,93	367,30	4,2 x 10 ⁻³	0,96
30	292,86	2,37 x 10 ⁻³	0,93	303,92	5,1 x 10 ⁻³	0,94
37	201,07	3,44 x 10 ⁻³	0,92	242,19	6,4 x 10 ⁻³	0,92

^aEl error típico en los valores de *K* fueron inferiores a 5 x 10⁻⁵

Las constantes de velocidad para la degradación de la vitamina A para una cinética de orden uno en la leche de crecimiento aumentaron de 1,77 x 10⁻³ días para la temperatura de 23°C a 3,44 x 10⁻³ días para la temperatura de 37°C, y el periodo de vida medio descendió de 391,76 días a 201 días como consecuencia del incremento de la temperatura de 23 a 37°C. Si tenemos en cuenta la cinética de orden cero, las constantes de velocidad fueron ligeramente más elevadas para cada una de las temperaturas comparadas con la cinética de orden uno, aumentando de 4,2 x 10⁻³ para los 23°C a 6,4 x 10⁻³ para los 37°C, este aumento estuvo correlacionado con la disminución de la vida media de la concentración de la vitamina A, variando de 367,30 a 242,19 días como consecuencia del aumento de la temperatura. Los datos obtenidos para la constante de velocidad para cada temperatura en un modelo cinético de orden uno son inferiores a los obtenidos por Albalá-Hurtado y col (2000b). Según estos autores, las constantes de velocidad a 20, 30 y 37°C en una leche Junior o de crecimiento fueron 1,26 x 10⁻², 4,29 x 10⁻² y 1,00 x 10⁻¹ respectivamente, valores que son diez veces más elevados a los nuestros e incluso unas 100 veces a la T^a de 37°C. Sin embargo, sus coeficientes de determinación a 20 y 30°C eran inferiores a 0,90 salvo a los 37°C que fueron > 0,90. En nuestro caso, esto no fue así ya que obtuvimos coeficientes > 0,90 es todos los casos. De todas maneras, las concentraciones de inicio fueron inferiores a las nuestras por lo que obtener una comparación directa con sus datos no sería del todo fiable.

En la Figura 22, se representa la ecuación de Arrhenius para la degradación de la vitamina A en la leche de crecimiento en un modelo cinético de orden uno y cero, respectivamente.

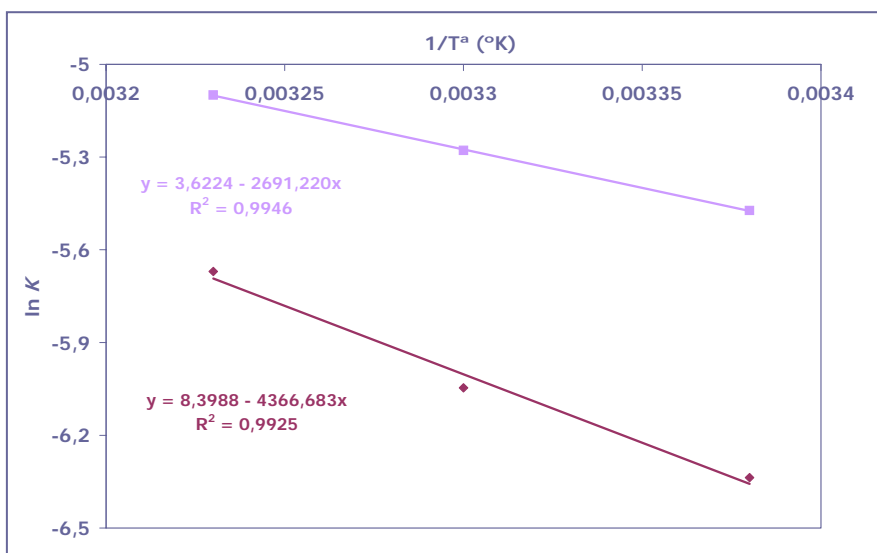


Figura 22. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina A en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.

La energía de activación para la reacción de orden uno fue de 8,68 Kcal mol⁻¹ y para la de orden cero de 5,35 Kcal mol⁻¹. Estos valores fueron muy inferiores a los obtenidos por Albalá-Hurtado y col (2000b), cuya energía de activación fue aproximadamente de 22 Kcal mol⁻¹. En un estudio realizado por Galdi y col. (1989), donde compararon el tipo de compuesto de hierro (compuesto de hierro soluble, sulfato ferroso frente a un quelato de hierro-aminoácido, glicinato férrico) sobre la degradación de las vitaminas en una fórmula infantil, observaron un efecto significativo en el compuesto de hierro sobre la degradación de las vitaminas (C, A, B1, B2, E). El sulfato ferroso fue el compuesto de hierro que más pérdidas provocaba en las vitaminas durante el periodo de almacenamiento de un año y sugiriendo el uso del quelato de hierro por sus propiedades menos catalíticas, demostrado por sus inferiores energías de activación obtenidas en las vitaminas A, E, B1 y B2. En nuestro caso, no se compararon dos fuentes de hierro, pero puede ser un factor importante en la degradación de la vitamina A, en este caso. La energía de activación obtenida por Galdi y col (1989) fue de 8,9 Kcal mol⁻¹ prácticamente igual a la obtenida en nuestro estudio de 8,8 Kcal mol⁻¹.

Al igual que con la vitamina C, se puede representar las expresiones generales tanto para la cinética de orden uno como de orden cero:

Orden uno

$$\text{Vit A} = 3,10 \times e^{(-4442,62 \times t \times e \text{ Exp } (-4366,7/T))}$$

Orden cero

$$\text{Vit A} = 3,10 - 37,41 \times t \times e^{(-2691,2/T)}$$

Además, dado que hay un efecto entre el tiempo de almacenamiento, la concentración de la vitamina A y la temperatura, podríamos cuantificar esta relación mediante una aproximación lineal a través de una regresión. De este modo la ecuación sería la siguiente:

$$\text{Vit A} = 14,951 - 0,005 t - 0,040 T, (R^2=0,920)$$

De acuerdo con esta ecuación, la concentración de la vitamina A disminuiría a un velocidad de 0,005 mg/ día con un error típico de 0,0001, y 0,040 mg/T con un error típico de 0,004.

1.3.4. Vitamina D

La pérdida de vitamina D en la leche líquida de crecimiento tanto para un modelo cinético de primer orden como de orden cero en todas las temperaturas fueron muy similares, tal y como lo demuestran los coeficientes de correlación. En las Figuras 23 y 24, se representan la relación entre la degradación de la vitamina D frente al tiempo de almacenamiento, expresado en días.

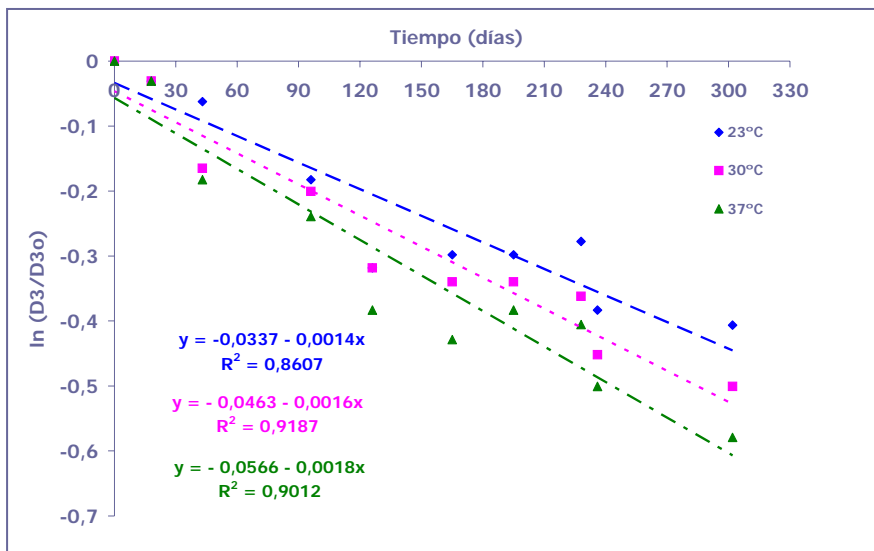


Figura 23. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina D3 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas.

La vitamina D en la leche de crecimiento mostró un R^2 para la reacción de orden uno de 0,86 para la temperatura de 23°C, mientras que para la reacción de orden cero fue de 0,85. La misma situación se mostró para las demás temperaturas, siendo los coeficientes de determinación para las reacciones de orden uno similares a los de orden cero. Ambos coeficientes de determinación fueron prácticamente idénticos, y con los escasos datos disponibles en la bibliografía, no es posible asegurar si las pérdidas de la vitamina D siguen una ecuación cinética de orden uno o cero, por tanto sería necesario aumentar el tiempo o las temperaturas de almacenamiento.

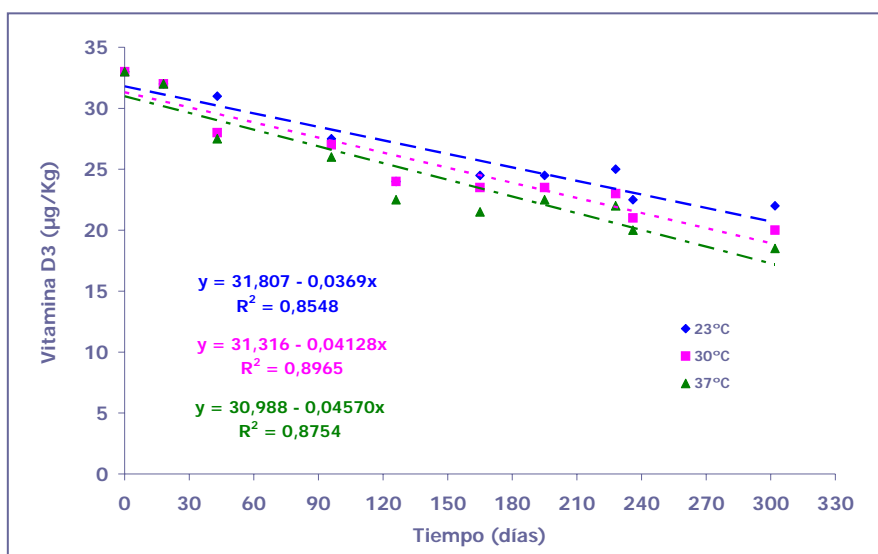


Figura 24. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina D3 en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

En la Tabla 25, se muestra la constante de velocidad tanto para una cinética de orden uno como de orden cero y la vida media de la vitamina D3 en la leche de crecimiento para cada una de las temperaturas.

Tabla 25. Constante de la velocidad^a (*K*), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina D3 y los coeficientes en una leche de crecimiento líquida.

T (°C)	Vitamina D3					
	Cinética de orden uno			Cinética de orden cero		
	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (días ⁻¹)	R ²	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (mg/Kg días)	R ²
23	508,56	1,36 x 10 ⁻³	0,86	425,67	3,70 x 10 ⁻²	0,85
30	434,75	1,59 x 10 ⁻³	0,92	381,40	4,13 x 10 ⁻²	0,89
37	380,45	1,82 x 10 ⁻³	0,90	344,64	4,57 x 10 ⁻²	0,88

^aEl error típico en los valores de *K* fueron inferiores a 5 x 10⁻⁵

Las constantes de velocidad para la degradación de la vitamina D3 para una cinética de orden uno en la leche de crecimiento aumentaron de 1,36 x 10⁻³ días para la temperatura de 23°C a 1,82 x 10⁻³ días para la temperatura de 37°C, y el periodo de vida medio descendió de 508,56 días a 308,45 días como consecuencia del incremento de la temperatura de 23 a 37°C. Si tenemos en cuenta la cinética de orden cero, las constantes de velocidad fueron ligeramente más elevadas para cada una de las temperaturas comparadas con la cinética de orden uno, aumentando de 3,70 x 10⁻² para los 23°C a 4,57 x 10⁻² para los 37°C, este aumento estuvo correlacionado con la disminución de la vida media de la concentración de la vitamina D3, variando de 425,67 a 344,64 días como consecuencia del aumento de la temperatura. Carecemos de datos en la cinética de degradación de la vitamina D en productos similares a los nuestros. No obstante, Renken y Warthesen (1993) observaron que al exponer una leche desnatada a la luz, aire y a la combinación de ambos factores, ésta seguía una cinética de orden uno. Además, sugirieron que la sola la luz causó las mayores pérdidas, seguida de la combinación de la luz y el aire, y en menor medida el aire.

También observaron que no hubo evidencias directas de que la aireación de la leche durante su fabricación afectara a la estabilidad de la vitamina D3. Sin embargo, claramente se pudo observar que la temperatura sí afecto a la concentración de la vitamina D3 a lo largo de los nueve meses de almacenamiento. Siendo la temperatura más extrema (37°C) la que proporcionó las mayores pérdidas. Los coeficientes de regresión para la cinética de orden uno fueron ligeramente más altos que los de orden cero. La leche es un sistema mucho más complejo y además contiene riboflavina, un compuesto fotosensible. Se sabe que la riboflavina acelera la oxidación de la vitamina D por la presencia de un oxígeno singlete bajo la luz pero que afecta a la oxidación de la vitamina D en la oscuridad. La adición de 15 ppm de riboflavina tiene un efecto significativo en las pérdidas de la vitamina D bajo la luz. Además, la ausencia de la riboflavina o de la luz resultó en ninguna pérdida de la vitamina D presente en la leche (Min y Boff, 2002).

En la Figura 25, se representa la ecuación de Arrhenius para la degradación de la vitamina D3 en la leche de crecimiento en un modelo cinético de orden uno y cero, respectivamente.

El efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la degradación de la vitamina D3, tanto para una cinética de orden uno como de orden cero mostró un coeficiente de regresión de 0,999. La energía de activación para la reacción de orden uno fue de 2,09 Kcal mol⁻¹ y para la de orden cero de 2,76 Kcal mol⁻¹, sugiriendo una mayor dependencia de la temperatura en la velocidad de degradación de la vitamina D.

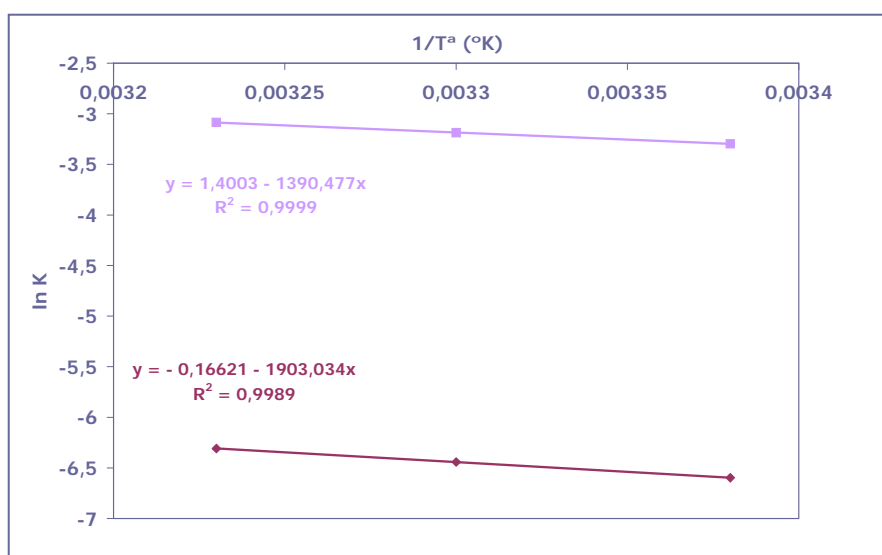


Figura 25. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina D3 en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (■) en una leche de crecimiento líquida.

Al representar las expresiones generales tanto para la cinética de orden uno como de orden cero, que nos relacione la temperatura y el tiempo, quedarían de la siguiente manera:

Orden uno

$$\text{Vit D} = 31,50 \times e^{(-1.1808 \times t \times e \text{ Exp } (-1903,03/T))}$$

Orden cero

$$\text{Vit D} = 31,50 - 4,056 \times t \times e^{(-1390,5/T)}$$

Además, dado que hay un efecto entre el tiempo de almacenamiento, la concentración de la vitamina D y la temperatura, podríamos cuantificar esta relación mediante una aproximación lineal a través de una regresión. De este modo la ecuación sería la siguiente:

$$\text{Vit D} = 75,738 - 0,041 t - 0,146 T, (R^2=0,935)$$

De acuerdo con esta ecuación, la concentración de la vitamina D disminuiría a un velocidad de 0,041 µg/día con un error típico de 0,002, y 0,146 µg/T con un error típico de 0,036.

1.3.5. Vitamina E

La pérdida de vitamina E en la leche líquida de crecimiento siguió un modelo cinético tanto de primer orden como de orden cero en todas las temperaturas, y al igual que las otras vitaminas liposolubles, los coeficientes de determinación tanto para la cinética de primer orden como de orden cero fueron muy similares. En las Figuras 26 y 27, se representan la relación entre la degradación de la concentración de la vitamina E frente al tiempo de almacenamiento, expresado en días.

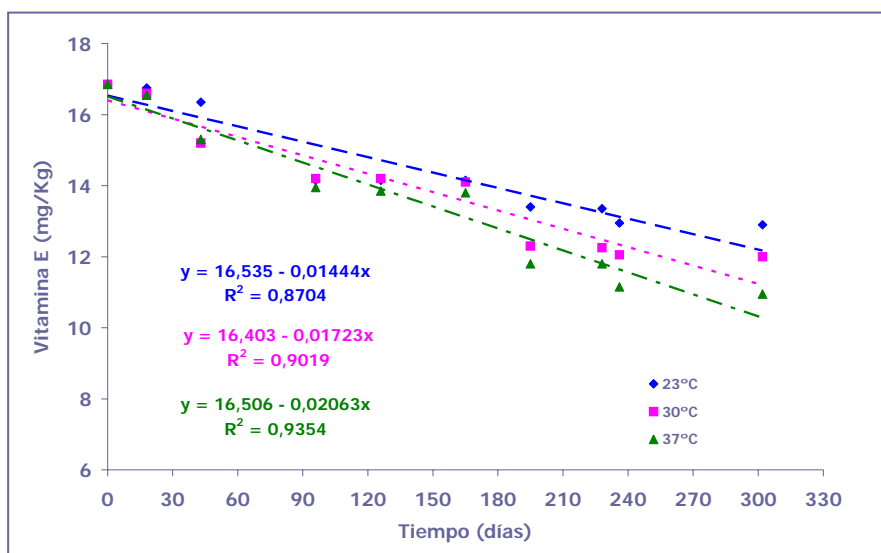


Figura 26. Gráfica de primer orden de la degradación de la vitamina E en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

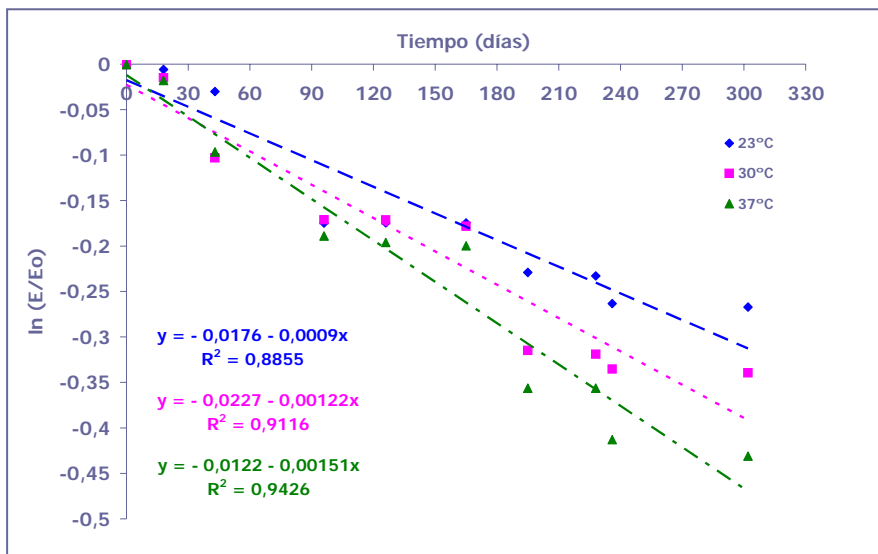


Figura 27. Gráfica de orden cero de la degradación de la vitamina E en una leche de crecimiento líquida a diferentes temperaturas

En la Tabla 26, se muestra la constante de velocidad tanto para una cinética de orden uno como de orden cero y la vida media de la vitamina E en la leche de crecimiento para cada una de las temperaturas.

Tabla 26. Constante de la velocidad^a (*K*), tiempo de vida media de la degradación de la vitamina E y los coeficientes de determinación en una leche de crecimiento líquida.

T (°C)	Vitamina E					
	Cinética de orden uno			Cinética de orden cero		
	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (días ⁻¹)	<i>R</i> ²	<i>t</i> _{1/2} (días)	<i>K</i> (mg/Kg días)	<i>R</i> ²
23	709,25	$9,77 \times 10^{-4}$	0,89	585	$1,44 \times 10^{-2}$	0,87
30	567,50	$1,22 \times 10^{-3}$	0,91	490	$1,72 \times 10^{-2}$	0,90
37	457,56	$1,51 \times 10^{-3}$	0,94	409	$2,06 \times 10^{-2}$	0,94

^aEl error típico en los valores de *K* fueron inferiores a 5×10^{-5}

Las constantes de velocidad para la degradación de la vitamina E para una cinética de orden uno en la leche de crecimiento fueron muy inferiores a las obtenidas en el modelo cinético de orden cero, esto nos sugiere que una degradación más lenta en el tiempo, aumentando de $9,77 \times 10^{-4}$ días para la temperatura de 23°C a $1,51 \times 10^{-3}$ días para la temperatura de 37°C, y el periodo de vida medio para que la concentración de la vitamina E se degrade a la mitad descendió de 709 días a 458 días como consecuencia del incremento de la temperatura de 23 a 37°C. Si tenemos en cuenta la cinética de orden cero, las constantes de velocidad fueron ligeramente más elevadas para cada una de las temperaturas comparadas con la cinética de orden uno, aumentando de $1,44 \times 10^{-2}$ para los 23°C a $2,06 \times 10^{-2}$ para los 37°C, este aumento en la velocidad de degradación para la vitamina E hizo disminuir la duración en el tiempo de la vitamina E, ya que su vida media se acortaría si la comparamos con el tiempo de vida media en un modelo cinético de orden uno, variando de 585 a 409 días como consecuencia del aumento de la temperatura.

En la Figura 28, se representa la ecuación de Arrhenius para la degradación de la vitamina E en la leche de crecimiento en un modelo cinético de orden uno y cero.

El efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la degradación de la vitamina E, tanto para una cinética de orden uno como de orden cero mostró un coeficiente de determinación de 0,999. La energía de activación para la reacción de orden uno fue de 5,71 Kcal mol⁻¹ y para la de orden cero de 4,64 Kcal mol⁻¹. Tomando como referencia estudios donde han establecido que la degradación de la vitamina E en el tiempo sigue un modelo cinético de orden uno (Widicius y Kira, 1981; Galdi y col., 1989), podemos establecer que la relación de dependencia entre ambas variables es muy estrecha.

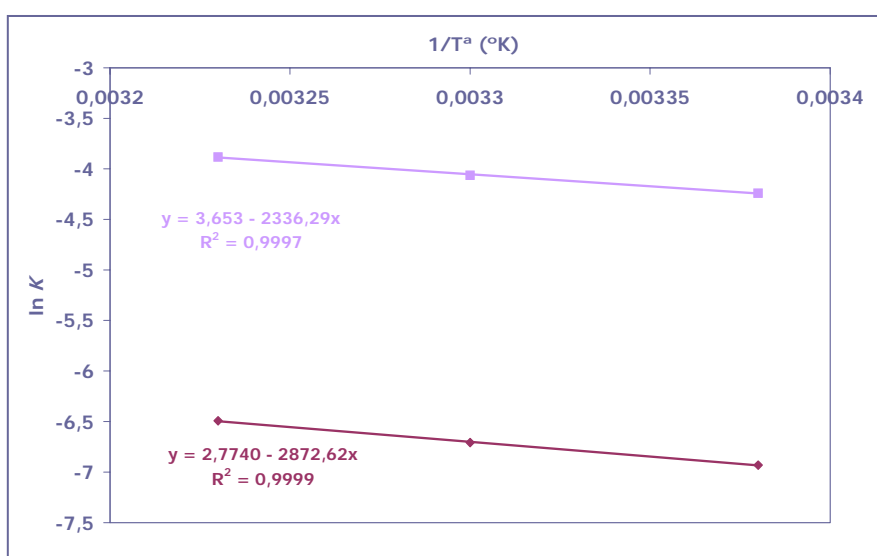


Figura 28. Efecto de la temperatura (23°, 30° y 37°C) sobre la velocidad de degradación de la vitamina E en un modelo cinético de orden uno (◆) y cero (▲) en una leche de crecimiento líquida.

Al representar las expresiones generales tanto para la cinética de orden uno como de orden cero, que nos relacione la temperatura y el tiempo, quedarían de la siguiente manera:

Orden uno

$$\text{Vit E} = 16,85 \times e^{(-16,023 \times t \times e \text{ Exp } (-2872,6/T))}$$

Orden cero

$$\text{Vit E} = 16,85 - 38,590 \times t \times e^{(-2336,3/T)}$$

Además, dado que hay un efecto entre el tiempo de almacenamiento, la concentración de la vitamina E y la temperatura, podríamos cuantificar esta relación mediante una aproximación lineal a través de una regresión. De este modo la ecuación sería la siguiente:

$$\text{Vit E} = 35,960 - 0,017 t - 0,064 T, (R^2=0,90)$$

De acuerdo con esta ecuación, la concentración de la vitamina C disminuiría a un velocidad de 0,017 mg/ día con un error típico de 0,001, y 0,064 mg /T con un error típico de 0,014.

ESTUDIO II

2. BIOACCESIBILIDAD DE FOLATOS EN UNA LECHE DE CRECIMIENTO LÍQUIDA ENRIQUECIDA CON ÁCIDO FÓLICO O (6S)-5-MTHF.

En este segundo estudio se seleccionó la leche de crecimiento líquida enriquecida con ácido fólico (AF) y se comparó con una leche de crecimiento líquida de igual composición pero enriquecida con la forma de folato sintético [6S]-5-MTHF (Metafolin[®], MF).

En la Tabla 27 se representa el contenido de folato de la fórmula preparada de acuerdo al proceso requerido en la digestión dinámica, tal y como es introducida en el TIM[®]. Este valor hace referencia a la cantidad de folato que se determinó tras la disolución de la leche de crecimiento con la solución electrolítica, expresado en µg/300 ml. No se observaron folatos endógenos, los cuales pueden destruirse durante el procesado de la leche. La Tabla 27 recoge también los resultados de las cantidades de folatos en el dializado yeyunal e ileal, así como la fracción bioaccesible.

Tabla 27. Contenido de folatos en las leches de crecimiento líquidas enriquecidas con AF y MF en el dializado yeyunal e ileal.

1) Muestras	Folato (µg/300 ml)	Dializado yeyunal (µg/100 g)	Dializado ileal (µg/100 g)	Fracción Bioaccesible ¹
2) Leche+AF	121,68 ± 0,49	32,12 ± 0,59	7,33 ± 0,13 ^a	39,45 ± 0,72 ^a
Leche+MF	121,15 ± 0,64	30,09 ± 2,37	4,74 ± 0,08 ^b	34,83 ± 2,29 ^b

¹ Fracción Bioaccesible (µg/100 g) = Dializado yeyunal + Dializado ileal

^{a-b} Indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) dentro de la misma columna

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 27, el AF y el MF mostraron un mismo comportamiento de accesibilidad en las dos leches de crecimiento, con valores de entre 30,09 y 32,12 µg/100 g para el dializado yeyunal, 4,74 y 7,33 µg/100 g para el dializado ileal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los valores de dializado yeyunal entre ambas leches, pero sí para el dializado ileal y la fracción bioaccesible que mostró valores medios de 39,45 y 34,83 µg/100 g para la leche+AF y la leche+MF, respectivamente.

En la Tabla 28 se muestran las fracciones no bioaccesibles obtenidas tras el proceso de digestión dinámica, estimada a partir de la cantidad de folato recogida en el liberado ileal y la cantidad excretada. En este caso se observan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las dos leches para la fracción de liberado ileal y la cantidad excretada, y por tanto para la fracción no bioaccesible.

Tabla 28. Contenido de folatos en las leches de crecimiento líquidas enriquecidas con AF y MF en el liberado ileal y excretado.

Muestras	Liberado ileal ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Excretado ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Fracción no Bioaccesible ¹
Leche+AF	15,18 \pm 0,18 ^a	67,04 \pm 0,06 ^b	82,23 \pm 0,23 ^a
Leche+MF	11,03 \pm 0,29 ^b	75,29 \pm 2,54 ^a	86,32 \pm 2,83 ^b

¹Fracción no Bioaccesible = Liberado ileal + Excretado

^{a-b} Indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) dentro de la misma columna

En cuanto a la dinámica de dializado para el AF y el MF presente en la leche de crecimiento líquida (Figura 29), observamos que el dializado yeyunal presentó el mismo comportamiento para ambas fórmulas, mostrando el valor máximo a la segunda hora de digestión *in vitro*. Después de 120 minutos, el dializado yeyunal para ambas leches de crecimiento disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a medida que transcurría el tiempo, sin embargo no se observaron diferencias en el dializado yeyunal total (Tabla 19).

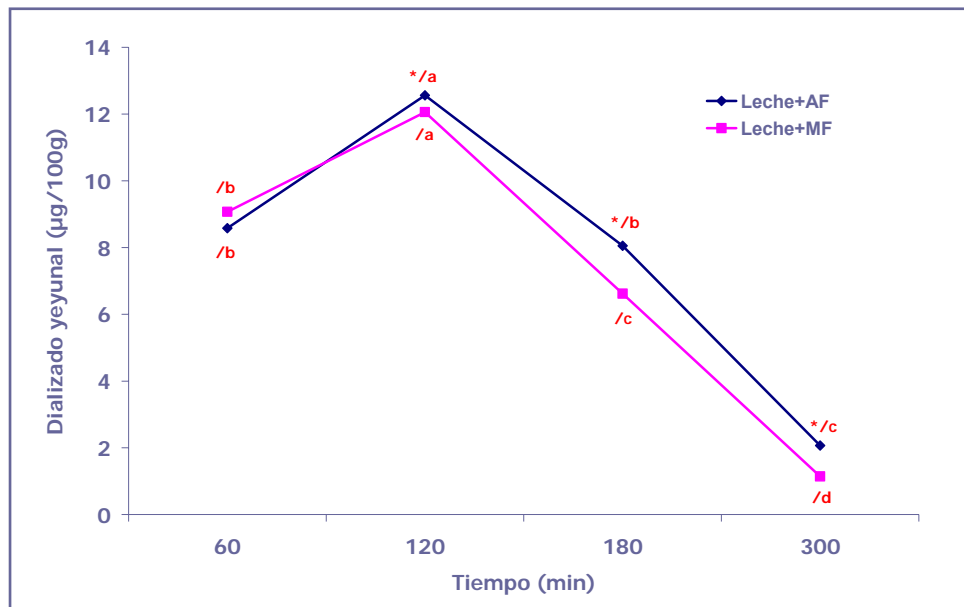


Figura 29. Contenido de folatos en el dializado yeyunal a los 60, 120, 180 y 300 min, en las leches de crecimiento líquidas enriquecidas con AF y MF.

*Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tipos de leches enriquecidas con AF o MF en cada periodo de tiempo.

^{/a-d} Diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tiempo para un mismo tipo de leche de crecimiento enriquecida con AF o MF.

La cinética de absorción para el dializado ileal mostró un comportamiento similar al dializado yeyunal, pero con valores muy inferiores a las cantidades dializadas. Entre los 60 y 120 min. hubo un aumento, siendo éste último significativamente superior ($p < 0,05$). Posteriormente se observó un progresivo descenso en la cantidad de dializado ileal, alcanzando valores a los 300 min. inferiores a 0,5 μg para ambas leches de crecimiento enriquecidas con AF o MF (Figura 30). No obstante, las diferencias en el dializado ileal para ambas leches fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo, en

concreto a los 120 y 180 min. situación que permitió que se observaran diferencias significativas en el dializado ileal total (Tabla 27).

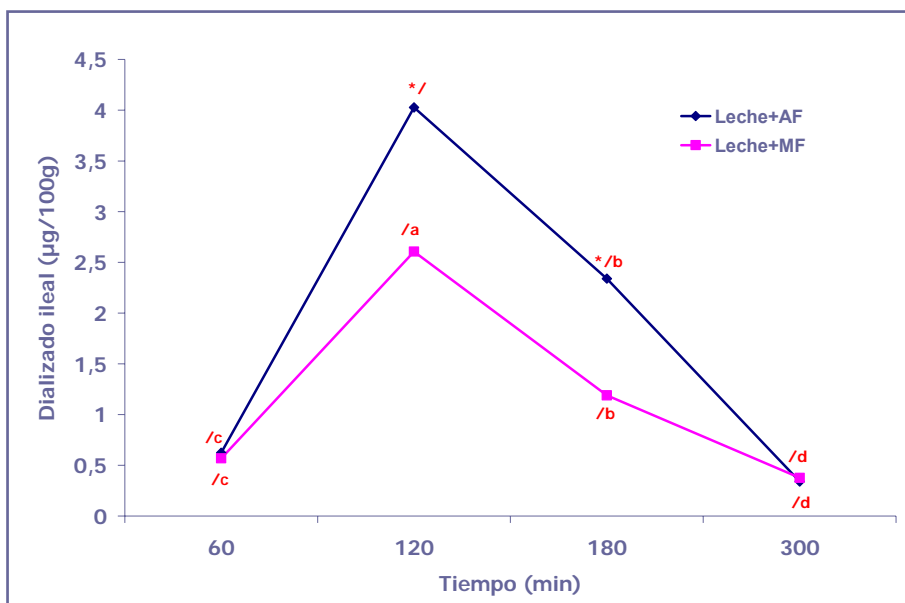


Figura 30. Contenido de folatos en el dializado ileal a los 60, 120, 180 y 300 min, en las leches de crecimiento enriquecidas con AF y MF.

*Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos tipos de leches enriquecidas con AF o MF en cada periodo de tiempo.

^{/a-d} Diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tiempo para un mismo tipo de leche de crecimiento enriquecida con AF o MF.

En cuanto al liberado ileal (Figura 31), la leche+AF siguió una cinética diferente a la leche+MF. En el caso de la leche+AF, la mayor liberación de folatos tuvo lugar durante las dos primeras horas de digestión (5,21 y 5,00 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente), descendiendo significativamente ($p < 0,05$) hasta alcanzar a los 300 min su valor más bajo (1,00 $\mu\text{g}/100\text{g}$). Por el contrario, durante las dos primeras horas la cantidad de folato liberados en la leche+MF se mantuvo constante (4,26 y 4,30 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente), pero luego entre los 120-180 minutos, se produjo un descenso significativo ($p < 0,05$) con respecto a los tiempos anteriores. Sin embargo, entre los 180-300 minutos aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) la cantidad de folatos liberados (2,16 $\mu\text{g}/100\text{g}$) con respecto a los 180 min.

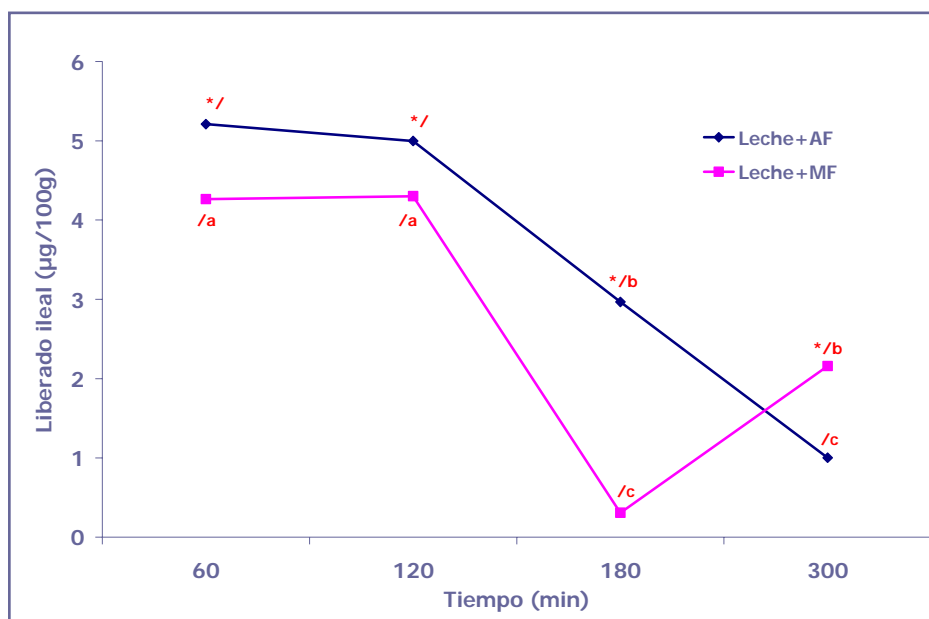


Figura 31. Contenido de folatos en el liberado ileal a los 60, 120, 180 y 300 min, en las leches de crecimiento líquidas enriquecidas con AF y MF.
 *Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tipos de leches enriquecidas con AF o MF en cada periodo de tiempo.
 /a-d Diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tiempo para un mismo tipo de leche de crecimiento enriquecida con AF o MF.

A la vista de los resultados sobre la fracción bioaccesible de ambas leches de crecimiento enriquecidas con AF y MF, se podría concluir diciendo que estas formas sintéticas de folatos se absorben parcialmente en el intestino delgado (fracción yeyunal e ileal), aunque una fracción importante es liberada hacia el colon y otra fracción que denominamos excretada se pierde a lo largo de proceso no encontrándose de forma bioaccesible. Esto coincide con los datos sobre la absorción de folatos en humanos y el hecho de que la mayor absorción de folatos se produzca dentro de las dos primeras horas tras aplicar el alimento al TIM (Prinz-Langenohl y col., 1999).

En la Tabla 29 se comparó el porcentaje de dializado yeyunal, ileal y del liberado ileal, así como el excretado, en las leches enriquecidas con AF y MF. El porcentaje de recuperación del dializado yeyunal fue superior al 58% en ambas leches de crecimiento. Por tanto, aproximadamente el 60% del folato adicionado a las leches de crecimiento se difundió a través de la membrana de diálisis, no observando diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras. En cuanto al porcentaje de recuperación del dializado ileal, la leche+AF mostró valores entorno al 12% y significativamente superiores ($p < 0,05$) a la leche+MF que alcanzó valores entorno al 8%. La bioaccesibilidad de los folatos expresada como porcentaje de recuperación, fue significativamente ($p < 0,05$) superior en la leche+AF (73,86%) respecto a la leche+MF (66,78%) Las cantidades de folatos en el liberado ileal fueron significativamente superiores en la leche+AF (3,14%) con respecto a la leche+MF (21,55%).

Al estimar los valores de folato excretado, principalmente degradado durante el proceso de digestión, las dos leches enriquecidas con AF o MF mostraron valores similares. Las cantidades excretadas fueron de 23% y del 28,67% en la leche+AF y leche+MF, respectivamente. Por lo tanto las fracciones bioaccesibles en la leche de crecimiento con AF o MF mostraron porcentajes de bioaccesibilidad por encima del 65%. Este hecho podría estar justificado por un elevado contenido en proteínas que puede originar un mayor contenido de proteínas fijadoras de folatos que interferirían en el proceso de diálisis. Un estudio realizado con yogur puso de manifiesto que la presencia de proteínas fijadoras de folatos interfiere la accesibilidad de los mismos apareciendo en el liberado ileal al no atravesar las membranas de diálisis durante el proceso de digestión *in vitro* en el TIM[®] (Arkbåge y col., 2003). No obstante, en estas leches líquidas el tratamiento tecnológico UHT es más intenso en cuanto a las condiciones de temperatura, por lo que las proteínas fijadoras se desnaturalizarían y no podrían ejercer el efecto inhibitorio en la bioaccesibilidad de los folatos.

Tabla 29. Porcentaje de recuperación del contenido de folatos del dializado yeyunal, ileal, liberado ileal y excretado en las leches de crecimiento enriquecidas con AF o MF entre las 0-5 horas del modelo gastrointestinal *in vitro*.

	Dializado yeyunal	Dializado ileal	Fracción bioaccesible	Liberado ileal	excretado
Leche+ AF	61,99 ± 1,49 ^a	11,87 ± 0,21 ^a	73,86 ± 0,37^a	3,14 ± 0,23 ^a	22,99 ± 0,58 ^a
Leche+MF	58,76 ± 1,93 ^a	8,02 ± 0,15 ^b	66,78 ± 1,78^b	2,55 ± 0,07 ^b	28,66 ± 5,16 ^a

^{a-b}Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Estos resultados demuestran que la mayor absorción *in vitro* de los folatos adicionados en la leche infantil se produce a nivel del intestino delgado, aunque el contenido de proteínas puede jugar un papel importante en el proceso. De hecho se ha observado que la digestión *in vitro* con el TIM[®] realizado con leche pasteurizada y leche UHT y con la adición de proteína fijadoras de folatos, la bioaccesibilidad del MF no se vio afectada (71-72%) ante la presencia de las proteínas mientras que la del AF descendió del 58-61% al 44-51% (Verwei y col., 2003). En otro estudio llevado a cabo por Verwei y col. (2006), los cuales combinaron el modelo TIM[®] para determinar la fracción bioaccesible y posteriormente, el transporte de folato a través de la pared intestinal usando las células Caco-2, observaron que la ingesta diaria de productos lácteos enriquecidos con 5-MTHF aumenta de manera significativa la concentración de folato en suero de humanos.

Los valores de bioaccesibilidad (66,78 y 73,86%) son interesantes de cara a la utilización de estos compuestos en el enriquecimiento de alimentos. Así la biodisponibilidad de distintas formas de folatos en los alimentos ha sido estimadas en un 50% (Sauberlich y col., 1987), mostrando el ácido fólico una biodisponibilidad del 85% frente a los folatos endógenos en los alimentos, que muestran valores menores del 50%. La biodisponibilidad

de los monoglutamatos puede variar entre el 70 y 120% con respecto al ácido fólico (100%) (Tamura y Stokstad, 1973). Desde un punto de vista fisiológico, el empleo del MF pondría ser interesante para el enriquecimiento de las fórmulas infantiles, debido a que en la etapa lactante se encuentra inhibida la enzima encargada de hidrolizar los poliglutamatos a monoglutamatos, para su posterior absorción, y muestra una elevada biodisponibilidad (Verwei y col., 2003). A partir de los seis meses de vida, se empieza a diversificar los alimentos y a introducir alimentación sólida a base de verduras, carne, legumbres y frutas, fuentes ricas de folatos. En algunos de estos alimentos encontramos inhibidores de la hidrolasa intestinal que actúan a pH ácido, como es el caso de verduras, frutas y legumbres (Wei y col., 1996).

Sin embargo, tenemos que remarcar la importancia que *a priori* parece tener el contenido de proteínas y el tratamiento térmico en la accesibilidad de los folatos sintéticos. Las hipótesis planteadas como conclusión de este estudio deberían de ser contrastadas con futuras investigaciones que permitan determinar el efecto de las proteínas de la leche en el proceso de accesibilidad de los folatos.

ESTUDIO III

3. BIODISPONIBILIDAD DEL BISGLICINATO FERROSO (BF) EN EL ENRIQUECIMIENTO DE UNA LECHE DE CRECIMIENTO LÍQUIDA. MÉTODO DE LA EFICIENCIA DE REGENERACIÓN DE LA HEMOGLOBINA (ERH).

Este método está basado en la repleción de la hemoglobina en ratas anémicas después de la suplementación con una fuente de hierro problema, teniendo como referencia la sal de hierro sulfato ferroso (SF) que se administra a un grupo control de ratas (Mahoney y Hendricks., 1982; Zhang y col., 1989).

3.1. Crecimiento y consumo de alimento

Durante el estudio fueron medidos distintos parámetros fisiológicos en los animales, tales como el peso corporal inicial y final, ganancia de peso, y la ingesta total de alimento (dieta AIN-93G + leche de crecimiento), con el objetivo de evaluar posibles diferencias en el consumo de los diferentes tipos de leche enriquecidas con BF o SF.

En la Tabla 30 se muestran los valores medios con sus desviaciones de los parámetros relacionados con el crecimiento y la ingesta en los animales alimentados con la leche de crecimiento I y II (Tabla 9 de la sección Material y Métodos) durante el periodo de balance.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia peso (g)	Ingesta total alimento (g)
Depleción	169,23 ± 8,46	192,57 ± 14,38	23,33 ± 7,56	150,31 ± 32,20
Control	176,37 ± 18,17	259,37 ± 33,89*	67,88 ± 19,06*	270,58 ± 44,92 ^{/b}
Repleción				
SF	168,63 ± 6,63	232,96 ± 7,94*	61,68 ± 4,88*	876,53 ± 14,31 ^{/a}
BF	170,65 ± 6,21	229,76 ± 3,45*	56,10 ± 10,88*	869,77 ± 34,45 ^{/a}

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

[/] La presencia de asteriscos indica diferencias significativas (p<0,05) con respecto al periodo de depleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

SF: Sulfato ferroso, BF: Bisglicinato ferroso

Al inicio del periodo de repleción, el peso inicial de los diferentes grupos de ratas fue similar entre sí. La ganancia de peso en el grupo en depleción (23,33g) fue significativamente inferior (p<0,001) al grupo control (67,88 g) y a los dos grupos replecionados con la leche de crecimiento enriquecida con SF y BF (61,68 y 56,10 g, respectivamente). Esta situación se debe al bajo consumo de alimento por parte del grupo en depleción, como consecuencia de los síntomas de una anemia deficiencia en hierro (Walter y col., 1997; Allen, 2000; Beard, 2001; Lozoff y Wachs., 2001; Haas y Brownlie., 2001; Peirano y col., 2001; Angulo-Kinzler y col., 2002), lo que provocó una menor ganancia de peso con respecto a los demás grupos. La clara diferencia en la ingesta total de alimento

por parte de los grupos alimentados con la leche de crecimiento con respecto a los otros grupos, se debe a que tanto el grupo control como el grupo en depleción la ingesta de líquido fue agua, la cual no se tuvo en cuenta por su poder acalórico, mientras que la ingesta de líquido en los grupos SF y BF fue a través de la leche de crecimiento I y II.

Según Wienk y col. (1999), la tasa de crecimiento disminuye cuando las ratas son deplecionadas en hierro. Además, cuando son replecionadas con hierro, en nuestro caso a través de la leche de crecimiento, la ingesta de hierro y la ganancia en la concentración de la hemoglobina están positivamente correlacionados con la ganancia de peso. Durante el periodo de repleción, tanto el grupo alimentado con la leche de crecimiento enriquecida con SF o con BF mostraron correlaciones positivas entre la ganancia en peso y la ingesta de hierro ($r = 0,958$ para el grupo SF y $r = 0,896$ para el grupo BF, ambos con un nivel de significación del $p < 0,001$). Lo mismo ocurrió entre la ganancia en peso y la ganancia de la hemoglobina ($r = 0,848$ para el grupo SF y $r = 0,941$ para el grupo BF, ambos con un nivel de significación de $p < 0,001$). Esto nos indica que ambas fuentes de hierro tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de las ratas, no observándose ninguna diferencia en los parámetros analizados (Tabla 30).

3.2. Balance mineral

Los resultados del estudio de la absorción del hierro son presentados en la Tabla 31. No se observaron diferencias significativas en la ingesta de hierro entre los grupos de ratas alimentadas con la leche de crecimiento enriquecida con SF (9,63 mg Fe) o BF (9,99 mg Fe), ni tampoco con respecto al grupo control (8,97 mg Fe). Sin embargo, se observaron diferencias claramente significativas ($p < 0,0001$) entre el grupo en depleción (0,39 mg Fe) frente al resto de grupos. La deficiencia de hierro nutricional aumenta cuando los requerimientos fisiológicos no pueden ser alcanzados por la absorción del hierro de la dieta (Zimmermann y Hurrell, 2007). Por tanto, la absorción del hierro aumenta en estados de deficiencia en hierro, es decir, cuando las reservas de hierro son bajas. En el caso de un estado más severo como la anemia por deficiencia en hierro, el suministro de oxígeno se ve comprometido. Por el contrario, la absorción de hierro desciende cuando las reservas de hierro son elevadas (Finch, 1994). Para el grupo en depleción, sus requerimientos para el hierro no son alcanzados, ya que la concentración de hierro en la dieta (2,5 mg/Kg) fue muy inferior a su nivel recomendado, por lo que su absorción se ve incrementada en todo el periodo de balance. De igual modo, las pérdidas de hierro fueron muy bajas (0,05 mg Fe), por lo que el balance del hierro fue también muy bajo (0,35 mg Fe). En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis del hierro se mantiene en equilibrio a través de la absorción del mismo en el intestino delgado proximal. De esta manera, en condiciones normales la absorción del hierro para las ratas empleadas en este estudio sería de 50-55%.

Para el grupo de ratas replecionadas con SF o BF a través de la leche de crecimiento, sus porcentajes de absorción del hierro fueron similares al mostrado por el grupo control, salvo el grupo SF (63,73%) que alcanzó un valor significativamente superior ($p < 0,05$) al control (54,55%).

Tabla 31. Balance del hierro en ratas anémicas alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes fuentes de hierro durante 28 días

	S	Ingesta hierro	Excreción hierro heces	Balance del hierro ¹	Absorción aparente ²
			mg		%
Depleción		0,39 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,35 ± 0,06	89,07 ± 6,98
Control		8,97 ± 0,68*	4,10 ± 0,69*	4,87 ± 0,33*	54,55 ± 5,02 ^{*b}
Repleción	S				
	SF	9,63 ± 0,14*	3,81 ± 0,59*	5,82 ± 0,72*	63,73 ± 3,62 ^{*a}
	BF	9,99 ± 0,56*	4,02 ± 0,68*	5,97 ± 0,71*	59,75 ± 6,40*

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

*La presencia de asteriscos indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al periodo de depleción.

^{a-b}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

¹Balance del hierro = Ingesta hierro (mg) – Excreción hierro heces (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta hierro (mg) – Excreción hierro heces (mg)] x 100 / Ingesta hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

En general, en situaciones de estrés fisiológico, como la hipoxia (Wheby y Crosby, 1964), anemia (Conrad y col., 1964, Weintraub y col., 1965), depleción de las reservas de hierro (Conrad y Crosby., 1963; Charlton y col., 1965) y una alimentación baja en hierro (Bannerman y col., 1962; Wheby y Crosby, 1964; Oates y Morgan, 1996) la absorción del hierro aumenta. Por este motivo los elevados valores en el porcentaje de absorción aparente para el grupo en depleción (89,07%) están justificados. Cuando existe un aporte continuo de hierro dentro de los niveles recomendados (35 mg/kg), el porcentaje de absorción aparente disminuye hasta alcanzar valores normales, como los presentados por el grupo control (54,55%). Esta disminución en el porcentaje de absorción aparente está inversamente correlacionada con la excreción fecal tanto en las ratas alimentadas con la leche de crecimiento con SF ($r = - 0,910$; $p < 0,0001$) como en las ratas alimentadas con la leche de crecimiento con BF ($r = -0,957$; $p < 0,0001$). Como sugirieron Layrisse y col. (1997), el porcentaje de la absorción aparente desciende a medida que la ingesta de hierro aumenta, pero sin embargo el hierro total absorbido, o lo que es lo mismo el balance del hierro, aumenta. Por tanto, para el grupo alimentado con la leche enriquecida con SF, hubo una correlación inversa entre el porcentaje de absorción aparente y la ingesta de hierro ($r = - 0,932$) y una correlación positiva entre la ingesta de hierro y el balance del hierro ($r = 0,989$), ambas con un nivel de significación de $p < 0,0001$. Para el caso del grupo alimentado con la leche enriquecida con BF, las correlaciones fueron: $r = - 0,923$ y $r = 0,990$, ($p < 0,0001$), respectivamente.

Estructuralmente el bisglicinato ferroso está formado por una molécula de hierro ferroso unida a dos moléculas de glicina para formar un doble anillo heterocíclico. La absorción del hierro del bisglicinato ferroso está regulada por los mismos mecanismos fisiológicos que otros compuestos de hierro inorgánicos. Tras una administración oral, el bisglicinato ferroso llega al pool de hierro inorgánico presente en la zona intraluminal del intestino, una vez allí es absorbido intacto por las células de la mucosa intestinal, y posteriormente es hidrolizado dando lugar al hierro ferroso y las moléculas de glicina. El hierro ferroso es por tanto metabolizado como cualquier otro compuesto de hierro (EFSA, 2006). En un estudio llevado a cabo por Pizarro y col. (2002), observaron que usando dosis que variaban de 0,5 a 100 mg de hierro, tanto en forma de bisglicinato ferroso como de sulfato ferroso en un ratio de 1:200 a 1:10, se demostró que el bisglicinato ferroso competían con el sulfato ferroso por la misma vía de absorción del hierro no hemo. En estudios de biodisponibilidad en humanos, la absorción del hierro del bisglicinato ferroso fue significativamente más elevada que la del sulfato ferroso, cuando fueron administrados juntos en una comida compuesta de maíz o harina de trigo (Bovell-Benjamin y col., 2000; Layrisse y col., 2000). La absorción del bisglicinato ferroso está regulada fisiológicamente por el estatus del hierro corporal, con una correlación inversa entre la absorción del hierro y la ferritina sérica (Olivares y col., 1997; lost y col., 1998; Bovell-Benjamin y col., 2000; Layrisse y col., 2000; Giorgini y col., 2001; Olivares y Pizarro., 2002). Además, hay que destacar su elevada solubilidad a pH fisiológico, permitiendo una elevada biodisponibilidad en alimentos a pesar de la presencia de inhibidores de la absorción del hierro como el ácido fítico. Su estructura formada por un doble anillo heterocíclico restringe las reacciones con los inhibidores de la absorción del hierro, favoreciendo por tanto su biodisponibilidad (Bovell-Benjamin y col., 2000; Layrisse y col., 2000; García-Casal y Layrisse, 2001; Jeppsen, 2001). En nuestro estudio se confirma la buena biodisponibilidad del hierro del bisglicinato ferroso, aunque la absorción del mismo no fue superior a la del sulfato ferroso.

3.3. Biodisponibilidad del hierro

La biodisponibilidad del hierro puede ser cuantificada como la cantidad de hierro adquirida por la hemoglobina durante el periodo de repleción (Anderson y col., 1972; Mahoney y col., 1974).

En la Tabla 32 se muestran los valores obtenidos de los parámetros necesarios para el cálculo de la eficiencia de la regeneración de la hemoglobina (ERH): hemoglobina inicial (Hb_i), hemoglobina final (Hb_f), hierro en la hemoglobina inicial ($FeHb_i$) y hierro en la hemoglobina final ($FeHb_f$). Los niveles de hemoglobina al inicio del periodo de repleción estaban dentro del nivel de referencia que establece el método oficial de la AOAC 974.31, (< 6,0 g/dl). Tanto el grupo en depleción como los dos grupos alimentados con la leche de

crecimiento enriquecida en SF o BF, presentaron un peso inicial, hemoglobina inicial y hierro en la hemoglobina inicial similares entre sí, es decir, mostraban un estado del hierro homogéneo. El grupo control nos sirvió para comparar los resultados obtenidos frente a una situación fisiológica adecuada. Obviamente, la concentración de la hemoglobina inicial y el contenido de hierro en la hemoglobina inicial del grupo control fue significativamente superior ($p < 0,001$) al resto de los grupos. Si nos fijamos en los parámetros finales, la concentración de la hemoglobina final de los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF (13,93 y 13,97 g/dl, respectivamente) fue superior al grupo control (12,84 g/dl), aunque esta diferencia no fue significativa. Ambos grupos alcanzaron valores en la concentración de la hemoglobina final superiores a 11,1 g/dl, límite inferior de referencia según Kaneko (1989) (Tabla 33).

Tabla 32. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH) en ratas anémicas alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes compuestos de hierro (SF o BF) durante los 28 días de repleción.

	Hb inicial	Hb final	FeHb inicial ¹	Fe Hb final ¹	ERH ²
	g/dl		mg		%
Depleción	4,55 ± 0,50	4,82 ± 0,37	1,75 ± 0,17	2,11 ± 0,20	91,95 ± 7,67
Control	11,92 ± 0,38 ^{*a}	12,84 ± 0,55 [*]	4,78 ± 0,41 ^{*a}	7,51 ± 0,87 [*]	29,31 ± 5,41 ^{*a}
Repleción					
SF	4,58 ± 0,48 ^{/b}	13,93 ± 1,07 [*]	1,76 ± 0,19 ^{/b}	7,30 ± 0,42 [*]	56,93 ± 4,14 ^{*b}
BF	4,55 ± 0,50 ^{/b}	13,97 ± 1,24 [*]	1,89 ± 0,17 ^{/b}	7,21 ± 0,58 [*]	53,75 ± 4,92 ^{*b}

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

[/]La presencia de asteriscos indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al periodo de depleción.

^{/a-b}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

¹ Fe Hb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

²ERH (%) = [Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100]/ Ingesta hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

El porcentaje de la biodisponibilidad del hierro, expresado como ERH, para el grupo de ratas alimentadas con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF (56,93 y 53,75%, respectivamente) fueron similares entre sí y estadísticamente superiores ($p < 0,0001$) al grupo control (29,31%). Este valor nos indica la proporción del contenido en hierro presente en la leche de crecimiento que fue utilizado por las ratas para la síntesis de la Hb en la médula ósea. La escasa bibliografía científica para valorar la biodisponibilidad del BF en un modelo de depleción-repleción en ratas, nos dificultó a la hora de establecer comparaciones con respecto a nuestro estudio, empleando como matriz del alimento una leche líquida. En un estudio llevado a cabo por Sakaguchi y col. (2004), para determinar la biodisponibilidad de varias sales de hierro añadidas a una dieta estándar, se observó que la biodisponibilidad del SF, pirofosfato férrico micronizado y el citrato ferroso-sódico fueron similares entre sí (52-55%) y la del grupo control fue del 30% tras un periodo de dos semanas. En este estudio aunque no se valoró la biodisponibilidad del BF, podemos compararlo con la del SF y el control. En ambos casos, la biodisponibilidad del hierro en ambos compuestos de hierro fue similar a los obtenidos por Sakaguchi y col (2004). El VBR (Valor Biológico Relativo),

calculado como el cociente de la ERH del BF y la ERH del SF (100%), del BF fue del 95,18%.

En nuestro estudio observamos que la ERH y la absorción aparente del hierro fueron significativamente más elevadas ($p < 0,0001$) en las ratas anémicas (grupo en depleción) que en las ratas alimentadas con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF y con las del grupo control, y además estos parámetros descendieron a medida que aumentaba la ingesta de hierro. Esto nos indica que ambos compuestos de hierro presentaban la misma biodisponibilidad y por tanto la misma asimilación en cuanto a su absorción, siendo aproximadamente el 50% del contenido de hierro presente en la leche asimilada por las ratas durante el periodo de repleción. Para el grupo alimentado con la leche enriquecida con SF, la correlación entre la ERH y la ingesta de hierro fue: $r = - 0,954$; $p < 0,001$. Mientras que para el grupo alimentado con la leche enriquecida con BF fue: $r = - 0,951$; $p < 0,001$. El mismo comportamiento lo encontramos en un estudio llevado a cabo por Buchowski y col. (1989) donde la ERH y la absorción aparente de hierro fueron mayores en ratas con anemia severa, siendo inversamente proporcional a la ingesta total de hierro.

Numerosos estudios en humanos han demostrado que el empleo del bisglicinato ferroso como suplemento dietético (niveles de 15 a 120 mg Fe/día) o como enriquecedor (niveles de 2 a 23 mg Fe/día) en alimentos es bien tolerado por niños deficientes en hierro, hombres adultos y mujeres embarazadas, y mujeres no embarazadas con un estado normal del hierro. Además, su empleo mejora de manera considerable los niveles de hemoglobina y ferritina, así como la capacidad total de fijación del hierro (CTFH) y las reservas de hierro en personas deficientes en hierro, sin observarse evidencias de sobrecarga de hierro en las personas replecionadas con el bisglicinato ferroso (Szarfarc y col., 2001).

En un estudio de 12 meses llevado a cabo por Queiroz y Torres (1995), la leche entera fue enriquecida con 3 mg Fe/l leche en forma de bisglicinato ferroso y administrada diariamente (1l/día) a 269 preescolares con anemia. La prevalencia de anemia fue significativamente reducida en estos niños, desde un 63% al inicio del estudio a un 26,4% al final del mismo. Iost y col. (1998) proporcionaron diariamente durante un periodo de 7 meses una leche enriquecida con bisglicinato ferroso (3 mg Fe/día) a 185 lactantes y niños de corta edad (6 meses a 2 años). A mitad del estudio, la concentración de hemoglobina aumentó significativamente en los niños de corta edad que inicialmente fueron diagnosticados con anemia severa. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la concentración de hemoglobina en los niños que presentaban niveles de hemoglobina normales. De acuerdo, con estos resultados los autores concluyeron que el enriquecimiento de una leche comercial con bisglicinato ferroso fue efectivo en el tratamiento de la deficiencia en hierro y la anemia deficiente en hierro. En otro estudio realizado en Arabia

Saudí, Osman y Al-Othaimeen (2002), administraron diariamente una leche enriquecida con bisglicinato ferroso (30 mg/L) a 131 adolescentes de edades comprendidas entre los 6 y 14 años, durante un periodo de 3 meses. El consumo total de hierro diario fue formulado a ser de 6 mg/niño. La administración de la leche enriquecida con bisglicinato ferroso no provocó problemas gastrointestinales a lo largo del estudio, tampoco se observaron indicadores de sobrecarga de hierro. Un 25,3% del total de los niños varones y un 23% de las niñas mostraban una concentración de hemoglobina <12 g/dl y después del tratamiento esta proporción se redujo significativamente ($p < 0,0001$) a un 5% en niños y a un 8,6% en las niñas. Los autores concluyeron que el enriquecimiento de la leche con bisglicinato ferroso fue una eficaz forma de mejorar la concentración de hemoglobina en niños anémicos o deficientes en hierro.

3.4. Índices hematológicos y bioquímicos

Al final del periodo de depleción, se realizó la determinación de los parámetros sanguíneos de la serie roja: hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM), parámetros bioquímicos relacionados con el transporte del hierro, como el hierro sérico (HS), capacidad total de fijación del hierro (CTFH) y el porcentaje de saturación de la transferrina (%ST) y la determinación de la ferritina sérica, que es un indicador de las reservas de hierro corporal. En la Tabla 33, se muestra el estado del hierro medido a través de los parámetros hematológicos y bioquímicos. Cada parámetro refleja cambios en diferentes compartimentos del cuerpo y están afectados según los diferentes niveles de la deficiencia en hierro.

Tabla 33. Diagnóstico de la anemia deficiente en hierro en ratas.

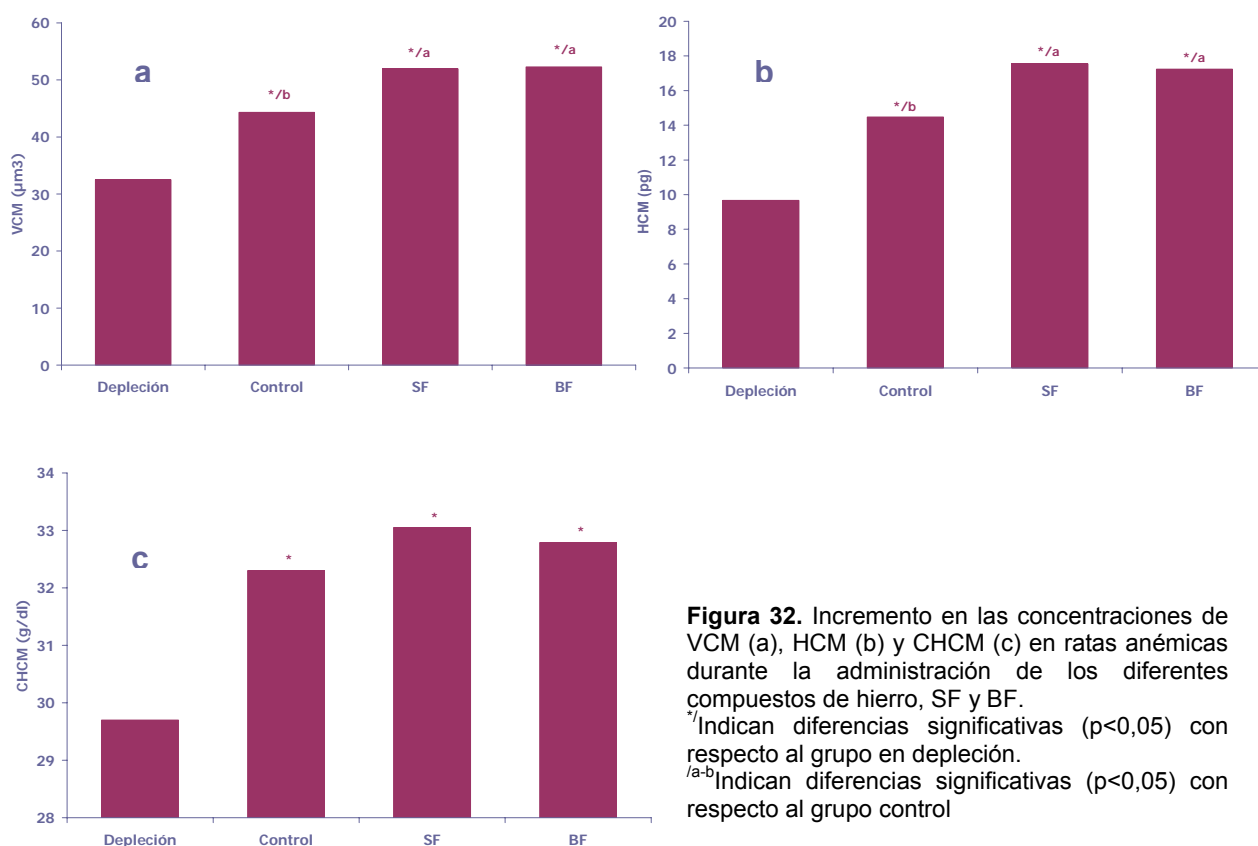
	Rango normal	Anemia deficiente en hierro
Hemoglobina (g/dl)	11,1-18,0	< 6
Hematocrito (%)	36-52	↓
Volumen corpuscular medio (μm^3)	44-69	↓
Hemoglobina corpuscular media (pg)	12-24,5	↓
Concentración hemoglobina corpuscular media (g/dl)	31-40	↓
Hierro sérico ($\mu\text{g/dl}$)	220±124	↓
Capacidad total de fijación del hierro ($\mu\text{g/dl}$)	368±124	↑
Saturación de la transferrina (%)	>16	↓

(Kaneko, 1989)

Durante la anemia deficiente en hierro, las reservas corporales de hierro se reducen, la saturación de la transferrina disminuye, la síntesis de la hemoglobina se reduce, y los eritrocitos sufren divisiones adicionales, dando lugar a la formación de eritrocitos microcíticos e hipocrómicos (Jain, 1993). Aunque las alteraciones en el metabolismo del hierro ocurren pronto en la deficiencia en hierro, los cambios morfológicos en los eritrocitos, tales como microcitosis e hipocromatosis, generalmente ocurren en los estados más

avanzados de la depleción del hierro, conduciendo a la anemia deficiente en hierro (Fairbanks y Beutler, 1995).

En la Figura 32 (a, b, y c) se representa los cambios del volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) respectivamente, al final del periodo de depleción y tras la administración de los compuestos de hierro en el periodo de repleción. El VCM, es uno de los índices eritrocitarios junto con la HCM y CHCM. Un descenso en el VCM, indica eritrocitos de menor tamaño (eritrocitos microcíticos), apareciendo cuando la deficiencia en hierro llega a ser severa y la anemia empieza a desarrollarse. Este descenso se ve claramente reflejado en la Figura 32a (superior izquierda), coincidiendo con el final del periodo de depleción. Tras el periodo de repleción, el tamaño de los eritrocitos (VCM) aumentó en los grupos alimentados con la leche enriquecida tanto con SF como con BF (51,93 y 51,28 μm^3 , respectivamente), y fue significativamente superior ($p < 0,001$) al grupo en depleción y al grupo control (32,55 y 44,31 μm^3 , respectivamente). Aparentemente, la ingesta de un compuesto de hierro u otro, favoreció la recuperación del tamaño de los eritrocitos, no existiendo alteración alguna durante la hematopoyesis.



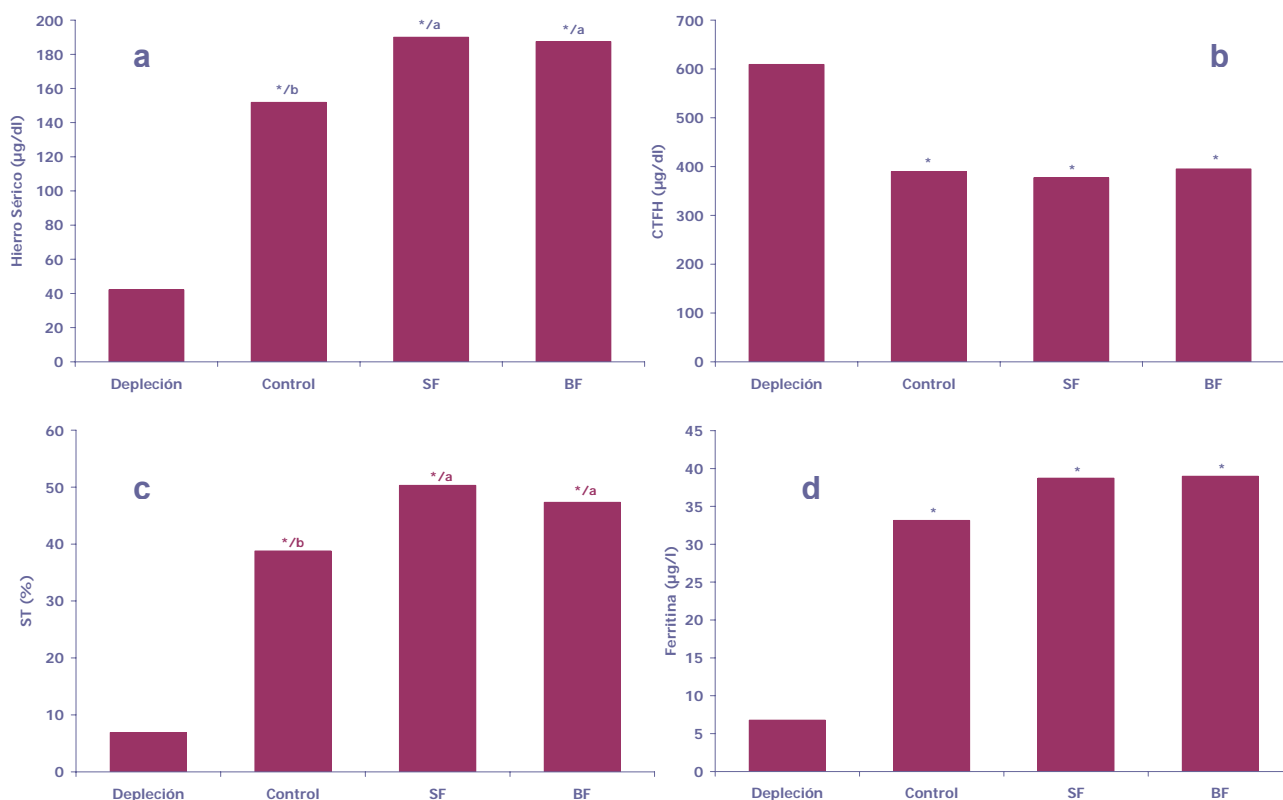
Otros índices eritrocitarios relacionados con la hemoglobina son la hemoglobina corpuscular media (HCM) (Figura 32b, superior derecha) y la concentración de la

hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Figura 32c, inferior izquierda). La HCM hace referencia al valor medio de la hemoglobina contenida en el eritrocito, mientras que la CHCM corresponde a la concentración de hemoglobina en un volumen de eritrocitos. La disminución de ambos parámetros tiene lugar por una deficiencia de hierro, y da lugar a la aparición de eritrocitos poco teñidos con un contenido de hemoglobina reducido (eritrocitos hipocrómicos). Los niveles reducidos de HCM y CHCM en el grupo en depleción nos indicaron que el contenido de hemoglobina en los eritrocitos fue bajo, debido al escaso suministro de hierro a la médula ósea durante la eritropoyesis (9,67 pg y 29,70 g/dl, respectivamente) se mostraron por debajo del límite inferior normal (Tabla 33). Finalizado el periodo de repleción, los niveles de HCM fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) (17,54 pg para el SF y 17,24 pg para el BF, respectivamente) al grupo en depleción y al control (14,48 pg). En el caso de la CHCM, se observó la misma tendencia que para la HCM, niveles bajos en depleción y normales en repleción comparada con el grupo control. Al igual que para el VCM, el tipo de hierro añadido a la leche de crecimiento no influyó significativamente en los niveles de HCM y CHCM.

Otro de los indicadores empleados para la evaluación de la anemia, fue la determinación del hierro sérico (HS), capacidad total de fijación del hierro (CTFH) y la saturación de la transferrina (%ST). El hierro sérico y la capacidad total de fijación del hierro son parámetros que se relacionan con el intercambio de hierro entre el sistema reticuloendotelial y la médula ósea. La transferrina es la principal proteína relacionada con el transporte de hierro en la sangre. Como consecuencia de ello, el contenido de hierro en el suero refleja el número de átomos de hierro unidos a la transferrina. Cada molécula de transferrina puede unir hasta dos átomos de hierro, razón por la cual la CTFH está relacionada con la fracción de los sitios libres que posee la transferrina para el transporte de hierro; por tanto el porcentaje de saturación de la transferrina puede calcularse como la relación entre el hierro sérico y la CTFH multiplicada por 100. Estos tres parámetros son particularmente útiles para diferenciar los estados deficitarios de hierro de causas nutricionales con respecto de aquellos que son consecuencia de diferentes patologías, asociadas a procesos de infección e inflamación crónicos (Boccio y col., 2003). Durante la eritropoyesis deficiente en hierro tiene lugar una restricción en el suministro del hierro a las células rojas en desarrollo, traduciéndose en una disminución del hierro sérico y un aumento de la transferrina, lo que determina que exista una reducción en la saturación de la transferrina. Además son útiles para el diagnóstico clínico de la anemia deficiente en hierro y las enfermedades inflamatorias crónicas (Huebers y col., 1987; Fairbanks y Klee., 1994) y como indicador de ciertas situaciones clínicas (Brittenham y col., 1981). Generalmente, la transferrina está aproximadamente saturada en un 30%, y niveles $< 16\%$ es indicativo de una deficiencia en hierro, por el contrario niveles $> 60\%$ son indicativos de una sobrecarga de hierro asociada a la hemacromatosis

hereditaria. La ferritina sérica está directamente relacionada al contenido de hierro de los depósitos. Existe una relación entre el contenido de hierro de los depósitos y las concentraciones séricas de la ferritina. Así, aproximadamente unos 8-10 mg de hierro en los depósitos es equivalente a 1 µg/l de ferritina sérica. Diferentes factores como la infección aguda o crónica, deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico, consumo excesivo de alcohol, leucemia, enfermedades hepáticas, etc., producen un aumento significativo de este parámetro. Sin embargo, los valores bajos de ferritina sérica <12 µg/l, están asociados a un déficit de hierro en los depósitos (Boccio y col., 2003).

La Figura 33 (a-d), representa los valores medios de HS, CTFH, %ST y ferritina sérica respectivamente, al final del periodo de depleción y repleción. Durante el periodo de depleción los niveles de HS, %ST y ferritina sérica fueron significativamente inferiores ($p < 0,01$) a cada uno de los grupos de ratas alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF. Por el contrario, la CTFH se mostró elevada al final del periodo de depleción y significativamente superior ($p < 0,01$) al resto de los grupos. Teniendo en cuenta que el %ST es el cociente entre el HS y CTFH, y es el indicador más preciso en el suministro de hierro a la médula ósea, una reducción en el %ST por debajo del 15% provoca alteraciones en la síntesis de la hemoglobina y por tanto en el desarrollo de los eritrocitos (NCCLS, 1995).



Figuras 33. Efecto de la ingesta de la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF sobre el HS (a), CTFH (b), ST (c) y Ferritina (d), en ratas anémicas durante un periodo de 28 días. * Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo en depleción. ^{/a-b} Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

Después de 28 días de repleción, la concentración de hierro sérico en los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF (190 y 187,48 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente) aumentó significativamente ($p < 0,01$) en relación al grupo en depleción (42,14 $\mu\text{g}/\text{dl}$) y al control (151,87 $\mu\text{g}/\text{dl}$). Este aumento no fue significativo entre los dos grupos de ratas replecionadas con la leche de crecimiento. En el caso de la CTFH, su tendencia fue a disminuir durante el periodo de repleción hasta alcanzar valores normales (Tabla 33), alcanzando valores similares al grupo control (389,80 $\mu\text{g}/\text{dl}$) para los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF (377,09 y 394,99 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente). El porcentaje de la saturación de la transferrina, aumentó significativamente ($p < 0,01$) en los grupos de ratas alimentadas con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF (50,32 y 47,32%, respectivamente) en comparación con el grupo en depleción (6,92%) y el grupo control (38,79%). De igual modo, los niveles de ferritina sérica aumentaron en los grupos de ratas tras la administración del SF o BF a través de la leche de crecimiento (38,74 y 38,98 $\mu\text{g}/\text{l}$, respectivamente) en relación a los grupos en depleción y control (6,77 y 33,14 $\mu\text{g}/\text{l}$, respectivamente). Con la finalidad de mantener las concentraciones plasmáticas de hierro dentro de un rango constante, existe un intercambio permanente de hierro entre la transferrina y los depósitos de hierro, formados por la ferritina y la hemosiderina, así, tras una ingesta de hierro abundante la transferrina transportará una cantidad significativa de hierro a los órganos de depósitos, por el contrario, cuando hay una demanda de hierro por algún tejido (deficiencia en la ingesta de hierro), la transferrina tomará el hierro de los depósitos para transferirlo a dicho tejido (Huebers y Finch, 1984; Cazzola, y col., 1985). Por tanto existe una correlación positiva entre el transporte del hierro (medido como el porcentaje de saturación de la transferrina) y los depósitos del mismo (medidos como ferritina), situación que ocurre en nuestro caso, siendo un coeficiente de correlación de 0,994 y una $p < 0,001$ para el grupo alimentado con la leche de crecimiento enriquecida con SF y para el grupo con BF una correlación de $r = 0,987$ ($p < 0,001$). De igual modo, existe una relación inversa entre la absorción del hierro y las reservas de hierro corporales, esta situación se debe a que en estados de deficiencia en hierro las reservas de hierro disminuyen como consecuencia de un déficit en la ingesta de hierro, lo que conlleva a que exista un aumento en la producción de la transferrina (niveles de CTFH) para transportar el hierro, pero como no hay una ingesta adecuada el hierro lo adquiere de las reservas de hierro (ferritina), para transportarlas hasta la médula ósea para que tenga lugar la eritropoyesis, en su mayor parte. En nuestro caso existió una correlación inversa entre la absorción del hierro (AA%) y las reservas corporales de hierro (ferritina), tanto para el grupo con SF ($r = - 0,937$; $p < 0,001$) como para el grupo con BF ($r = - 0,952$; $p < 0,001$).

El bisglicinato ferroso ha sido usado en numerosos estudios como compuesto de enriquecimiento en diversos tipos de alimentos en cantidades entre 2-23 mg/día, sin

observarse ningún efecto adverso en la salud de los participantes. En todos los casos, se observó una mejora sustancial en los indicadores del estado del hierro, incluyendo los niveles de hemoglobina y ferritina, así como la CTFH y las reservas de hierro comparado con un control. En un estudio llevado a cabo por Fisberg y col. (1995) con 81 niños de edades comprendidas entre 2-6 años y donde la prevalencia de anemia deficiente en hierro fue del 10%, se observó que tras la administración de 2 mg Fe/90 g de queso enriquecido con bisglicinato ferroso durante un periodo de 90 días, se produjo un descenso en la prevalencia de la anemia deficiente en hierro, aumentando los niveles de hemoglobina y las reservas de hierro en los niños. En otro estudio con 434 niños (9% entre 1-3 años y un 16% >15 años) recibieron una mantequilla de cacahuete enriquecida con bisglicinato ferroso (23 mg hierro/día) o sulfato ferroso (45 mg hierro/día) durante un periodo de tiempo. Gualandro y Name (1996) encontraron que ambos compuestos de hierro eran bien tolerados y que 23 mg de hierro como bisglicinato ferroso eran tan efectivos como 45 mg hierro de sulfato ferroso, en la corrección de la anemia deficiente en hierro. En otro estudio, Giorgini y col (2001) dieron a 89 niños preescolares unos rollos dulces preparados con harina y enriquecidos con bisglicinato ferroso, durante 6 meses, dos veces al día y 5 días a la semana. Estos autores observaron que la concentración de la hemoglobina aumentó significativamente y que la prevalencia de la anemia deficiente en hierro descendió de un 28% a un 9%. De igual manera, la prevalencia de las bajas reservas de hierro también descendió significativamente (de un 62% a un 25%) en todos los casos. Según estos autores, el mayor aumento en los niveles de ferritina sérica observado en los niños con los más bajos niveles de ferritina (comparado con los niveles de ferritina en niños normales) está relacionado con la regulación de la absorción del hierro del bisglicinato ferroso por las reservas de hierro.

Además, la suplementación dietética del hierro usada como bisglicinato ferroso, el cual proporciona aproximadamente de 15 a 120 mg Fe/día, ha sido bien tolerada en niños deficientes en hierro, hombres y mujeres adultos, y en mujeres no embarazadas con un estado de hierro normal. Además, no existieron evidencias de sobrecarga en los individuos replecionados con este compuesto de hierro. Además, no hubo evidencias de sobrecarga en los individuos replecionados con este compuesto de hierro

3.5. Almacenamiento del hierro

La concentración de hierro en el hígado y en otros órganos se puede utilizar como un indicativo del estado del hierro en ratas (Wienk y col., 1999). Sin embargo, las reservas de hierro en estos órganos no siempre apuntan a un incremento en la biodisponibilidad del compuesto de hierro en estudio. Existe una relación inversa entre la absorción del hierro y el estado del hierro (Magnusson y col., 1981; Taylor y col., 1988; Lynch y col., 1989; Flanagan,

1989; Hallberg y col., 1997). Además, un aporte de hierro en la dieta por debajo de sus necesidades fisiológicas lleva consigo una disminución de las reservas de hierro más rápida que la absorción del hierro, conduciendo a una deficiencia en este mineral. En la Tabla 34 se muestran las concentraciones de hierro total en las diferentes piezas anatómicas durante el periodo de balance.

Tabla 34. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con una leche de crecimiento líquida enriquecida con sulfato ferroso (SF) o bisglicinato ferroso (BF). Los resultados se expresan en mg/g peso seco.

	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Depleción	0,48 ± 0,14	0,36 ± 0,08	0,22 ± 0,05	0,26 ± 0,06	0,05 ± 0,01
Control	0,86 ± 0,14 ^{*/b}	0,57 ± 0,09*	0,27 ± 0,08	0,35 ± 0,04	0,08 ± 0,02
Repleción					
SF	1,64 ± 0,57 ^{*/a}	0,77 ± 0,16*	0,24 ± 0,08	0,36 ± 0,06	0,09 ± 0,02*
BF	1,17 ± 0,43 ^{*/ab}	0,95 ± 0,30*	0,27 ± 0,04	0,28 ± 0,07	0,11 ± 0,02*

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

^{*}La presencia de asteriscos indica diferencias significativas (p<0,05) con respecto al periodo de depleción.

^{/a-b}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Al inicio del periodo de repleción, la concentración de hierro en el hígado fue de 0,48 mg/g peso seco, y significativamente inferior (p<0,05) al grupo control, y a los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF o BF (1,64 o 1,17 mg/g peso seco, respectivamente). Teniendo en cuenta que las reservas de hierro son las primeras en deplecionarse durante una deficiencia en hierro, siendo la consecuencia más grave en una anemia deficiente en hierro, cuando la concentración de la hemoglobina desciende por debajo del límite inferior, es lógico establecer una relación directa entre la concentración de hierro en el hígado y la ferritina. En nuestro estudio esta situación si se pudo comprobar, siendo para el grupo con SF de $r = 0,625$ (p<0,01) y para el grupo BF de $r = 0,669$ (p<0,005). Esta correlación positiva nos indicó una rápida incorporación del hierro tanto en la forma de sulfato ferroso como en forma de bisglicinato ferroso. Además, no se observaron diferencias significativas entre ambas formas de hierro, durante el periodo de repleción. Sin embargo, para el grupo que tomaba la fuente de hierro como SF sí mostró diferencias significativas (p<0,05) con respecto al grupo control. En el caso del bazo, la concentración de hierro en depleción (0,36 mg/g peso seco) fue significativamente inferior (p<0,05) al grupo control (0,57 mg/g peso seco) y a los grupos alimentados con la leche enriquecida con SF o BF (0,77 o 0,95 mg/g peso seco, respectivamente). Además, no hubo diferencias entre el grupo control y los dos grupos replecionados. Destacar, que no se observaron diferencias significativas entre el grupo en depleción y el resto de los grupos, para la concentración de hierro en el riñón, corazón e intestino delgado. No obstante, la concentración de hierro en el hígado y en menor medida, en el bazo han sido generalmente usados como indicadores del estado de hierro corporal en las ratas (Park y col., 1987; Fairweather-Tait y col., 1991; Whittaker y col., 1996, 1997; Fischer y col., 2002).

En un trabajo realizado por Park y col. (1987), se observó que las ratas alimentadas con 30 mg de hierro elemental por Kg de dieta durante 30 días no provocaron en las ratas ningún efecto sobre el estado de salud. Otro hecho importante en la sobrecarga de hierro es que se caracteriza por la acumulación de hierro en los órganos parenquimales tales como el hígado, corazón, páncreas y órganos endocrinos. Las ratas afectadas muestran síntomas tales como una hipertrófia hepatocelular, cardiomiopatía, hemosiderosis, etc (Whittaker y col., 1996). En nuestro caso, estas lesiones no se observaron durante la extracción de los órganos para su posterior análisis.

ESTUDIO IV

4. INTERACCIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE HIERRO-FOLATOS AÑADIDAS A UNA LECHE DE CRECIMIENTO LÍQUIDA EN UNA DEFICIENCIA COMBINADA DE HIERRO-FOLATO SOBRE UN MODELO DE DEPLECIÓN-REPLECIÓN EN RATAS.

Las deficiencias de hierro y folato son desordenes nutricionales comunes en todo el mundo (WHO, 2000) y a menudo ocurren simultáneamente (O'Connor, 1991; Herbig y Stover., 2002). La frecuente coexistencia de la deficiencia de estos dos nutrientes condujo a los investigadores a examinar si su metabolismo estaba interconectado (O'Connor, 1991; Herbig y Stover., 2002). Chanarin y col (1965) fueron los primeros en sugerir que las deficiencias de hierro y folato no pueden desarrollarse independientemente. Los ensayos de folatos en animales han sido validados por muchos laboratorios (Hoppner y Lampi., 1985; Keagy y col., 1988; Balley y col., 1988; Keagy y Oace., 1989; Keagy, 1990; Rong y col., 1991; Krause y col., 1996) y han demostrado ser útiles en valorar la biodisponibilidad de muchas formas químicas de folatos. Se ha demostrado que las concentraciones de folatos en el hígado son las más elevadas (Henderson, 1990) y que la respuesta a la dosis se relaciona con la ingesta de folato y la concentración del mismo en el hígado (Keagy y Oace., 1984; Hoopner y Lampi, 1985). Además, la elevada sensibilidad del modelo depleción-repleción en ratas, la rápida renovación de los folatos en la rata y la oportunidad de cuantificar la disponibilidad de los folatos usando la concentración del mismo en el hígado además de los del plasma, hacen de este animal de experimentación un modelo útil en la valoración de la biodisponibilidad de los folatos (O'Leary y Sheehy., 2002).

4.1. Crecimiento y consumo de alimento

Durante el estudio se midieron distintos parámetros fisiológicos en los animales, tales como el peso corporal inicial y final, ganancia de peso, y la ingesta total de alimento (dieta AIN-93G + leche de crecimiento). Se estableció un grupo de referencia (grupo control), con el objetivo de establecer un baremo a la hora de ver si hay o no mejoras en las variables fisiológicas, debidas al consumo de los diferentes tipos de leche enriquecidas III-VI.

En la Tabla 35 se muestran los valores medios de los parámetros relacionados con el crecimiento y la ingesta en los animales alimentados con la leche de crecimiento III-VI (Tabla 9) durante el periodo de balance. El consumo de alimento para el grupo alimentado con una dieta deficiente en hierro-folato fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al resto de grupos. Este bajo consumo afectó a la ganancia de peso y por tanto al peso final, siendo ambos parámetros significativamente inferiores ($p < 0,05$) al resto de los grupos.

Tabla 35. Crecimiento e ingesta de alimento durante el periodo de balance de 28 días

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia peso (g)	Ingesta total alimento (g)
Depleción	170,65 ± 6,21	229,76 ± 3,45	56,10 ± 10,88	160,31 ± 31,14
Control	185,00 ± 10,31 ^b	283,03 ± 18,23 [*]	102,66 ± 18,13 [*]	248,13 ± 20,86 ^{*/c}
Repleción				
SF+AF	175,51 ± 6,76 ^b	271,14 ± 12,94 [*]	95,63 ± 12,08 [*]	842,36 ± 87,11 ^{*/b}
SF+MF	178,30 ± 6,36 ^b	284,45 ± 8,48 [*]	107,76 ± 6,69 ^{*/a}	890,78 ± 109,87 ^{*/ab}
BF+AF	173,12 ± 9,78 ^b	276,69 ± 7,53 [*]	103,71 ± 7,60 [*]	970,88 ± 68,23 ^{*/a}
BF+MF	210,19 ± 8,69 ^{*/a}	279,54 ± 30,91 [*]	80,22 ± 25,56 ^b	772,39 ± 48,05 ^{*/b}
ANOVA 2 X 2				
Fe	0,0001	NS	0,028	NS
Folato	0,0001	NS	NS	0,010
FexFolato	0,0001	NS	0,0001	0,0001

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

^{/a-c}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

NS: No Significación

^{*/}La presencia de asteriscos indica diferencias significativas (p<0,05) con respecto al periodo de depleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

SF: Sulfato ferroso, BF: Bisglicinato ferroso, AF: Ácido fólico y MF: Metafolin®.

Según Wienk y col. (1999), cuando son deplecionadas en hierro la tasa de crecimiento de las ratas disminuye. No se observaron signos físicos como consecuencia de la deficiencia en hierro-folato, tales como una tendencia de los párpados a cerrarse, debilidad del pelo de la cabeza, letargia, entre otros síntomas. Únicamente, se observó un descenso en la ganancia de peso como consecuencia de una reducida ingesta de alimento. Por tanto podemos destacar que hubo un efecto significativo (p<0,05) debido al tratamiento sobre el crecimiento de las ratas.

Los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con hierro-folatos, mostraron un ritmo de crecimiento muy similar entre ellos. Únicamente, se observaron diferencias puntuales en la ganancia de peso entre los grupos SF+MF y BF+MF (107,76 y 80,22 g, respectivamente), siendo éste último significativamente inferior (p<0,05) al otro grupo. También se observaron diferencias en la ingesta total de alimento, donde el grupo BF+AF (970,88 g) fue significativamente superior (p<0,05) a los grupos SF+AF y BF+MF (842,36 y 772,39 g, respectivamente). Además, la ingesta total de alimento por parte del grupo control (248,13 g) fue muy inferior y estadísticamente significativa (p<0,05) al resto de los grupos alimentados con la leche de crecimiento III-VI. Esta diferencia tan notable en la ingesta total de alimento, entre el grupo control y los grupos SF+AF, SF+MF, BF+AF y BF+MF, se debió a que el grupo control solamente fue alimentado con una dieta en polvo (dieta AIN93G + antibacteriano), mientras que para los demás grupos el principal alimento fue la leche de crecimiento, aunque también consumieron la dieta en polvo. La realización de un análisis lineal general univariante, nos permitió conocer si existió algún efecto según el tipo de compuesto de hierro o compuesto de folato. Tomando como variable más significativa la ganancia de peso, observamos que el tipo de compuesto de folato no tuvo

ningún efecto sobre la ganancia de peso. Sin embargo, la ganancia de peso si estuvo influida por el tipo de compuesto de hierro, en concreto entre los grupos SF+MF y BF+MF (Tabla 35).

4.2. Balance mineral

En la Tabla 36 se muestran los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro tanto en los grupos en depleción como en repleción, y un grupo control alimentado con la dieta AIN-93G y el succinilsulfatiazol.

Tabla 36. Balance del hierro de ratas deficientes en hierro-folato alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes fuentes de hierro y folato durante 28 días

	Ingesta hierro	Excreción hierro heces mg	Balance del hierro ¹	Absorción aparente ² %
Depleción	0,37 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,34 ± 0,02	92,00 ± 0,03
Control	8,68 ± 0,73 ^{*/b}	3,93 ± 1,09 [*]	4,82 ± 1,27 ^{*/b}	54,69 ± 12,37 ^{*/ab}
Repleción				
SF+AF	9,90 ± 1,33 ^{*/b}	3,23 ± 1,12 [*]	6,61 ± 1,64 ^{*/ab}	66,72 ± 12,07 ^{*/a}
SF+MF	10,22 ± 1,75 ^{*/ab}	3,63 ± 0,82 [*]	6,69 ± 1,90 ^{*/ab}	64,04 ± 9,53 ^{*/a}
BF+AF	11,69 ± 1,05 ^{*/a}	3,86 ± 1,28 [*]	7,72 ± 1,27 ^{*/a}	66,81 ± 10,04 ^{*/a}
BF+MF	8,30 ± 2,00 ^{*/b}	4,54 ± 1,58 [*]	3,65 ± 1,27 ^{*/b}	45,96 ± 10,77 ^{*/b}
Anova 2 x 2				
Fe	NS	0,044	0,048	0,009
Folato	0,002	NS	0,000	0,001
FexFolato	0,000	NS	0,000	0,008

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

^{*}La presencia de asteriscos indica diferencias significativas (p<0,05) con respecto al periodo de depleción.

^{/a-b}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

NS: No Significación

¹Balance del hierro = Ingesta hierro (mg) – Excreción hierro heces (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta hierro (mg) – Excreción hierro heces (mg)] x 100 / Ingesta hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

Los parámetros relacionados con el balance mineral para el grupo alimentado con la dieta deficiente en hierro-folato fueron significativamente inferiores (p<0,05) al resto de grupos. La mayor ingesta de hierro se observó en los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF+MF y BF+AF (10,22 y 11,69 mg, respectivamente), no existiendo diferencias entre ellos. Además, únicamente el grupo BF+AF mostró diferencias significativamente superiores (p<0,05) a los grupos SF+AF (9,90 mg), BF+MF (8,30 mg) y el grupo control (8,68 mg). La deficiencia de hierro nutricional aumenta cuando los requerimientos fisiológicos no pueden ser alcanzados por la absorción del hierro de la dieta (Zimmermann y Hurrell, 2007). Por tanto, la absorción del hierro aumenta en estados de deficiencia en hierro, es decir, cuando las reservas de hierro son bajas, y en el caso de un estado más severo como la anemia por deficiencia en hierro, el suministro de oxígeno se ve comprometido. Por el contrario, la absorción de hierro desciende cuando las reservas de hierro son elevadas (Finch, 1994). Para el grupo en depleción, sus requerimientos para el hierro no son alcanzados, ya que la concentración de hierro en la dieta (2,3 mg/Kg) fue muy

inferior a su nivel recomendado, por lo que su absorción se ve incrementada en todo el periodo de balance. De igual modo, las pérdidas de hierro fueron muy bajas (0,03 mg Fe), por lo que el balance del hierro fue también muy bajo (0,34 mg Fe). En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis del hierro se mantiene en equilibrio a través de la absorción del mismo en el intestino delgado proximal. De esta manera, en condiciones normales la absorción media del hierro para las ratas empleadas en este estudio sería de 54,69%. La absorción aparente para el grupo de ratas alimentadas con la leche de crecimiento enriquecida con SF +AF, SF+MF, BF+AF y BF+MF (66,72; 64,04; 66,81 y 45,96%, respectivamente) fueron muy similares, salvo para el grupo BF+MF, el cual fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al resto de los grupos replecionados y sin embargo similar al grupo control (54,69%).

El tipo de compuesto de hierro si afectó al porcentaje de absorción aparente, en concreto cuando la fuente de folato fue el Metafolin®, es decir, el porcentaje de absorción aparente para el grupo SF+MF (64,04%) fue significativamente superior ($p = 0,009$) al grupo BF+MF (45,96%). Por el contrario, los grupos SF+AF y BF+AF mostraron porcentajes de absorción aparente similares. Al estudiar si los compuestos de folato influyen en el porcentaje de absorción aparente, compararemos los grupos SF+AF y SF+MF, manteniendo como variable constante el compuesto de hierro SF. En este caso, no se observaron diferencias entre ellos, sin embargo, al comparar los otros dos grupos, BF+AF y BF+MF, los porcentajes de absorción del hierro fueron estadísticamente diferentes, siendo el grupo con ácido fólico el que mayor porcentaje de absorción aparente alcanzó (66,81%). En general, la absorción aparente del hierro del SF no se vio afectada por el tipo de compuesto de folato. Por el contrario, la absorción del hierro del BF si se vio afectada por la presencia de los compuestos de folato. Por tanto, la combinación de hierro-folato (BF+MF) fue la menos idónea en mejorar la absorción aparente de los otros tres grupos, aunque hay que destacar que su valor fue similar al obtenido por el grupo control.

Cuando existe un aporte continuo de hierro dentro de los niveles recomendados (35 mg/kg), el porcentaje de absorción aparente disminuye hasta alcanzar valores normales, como los presentados por el grupo control (54,69%). Esta disminución en el porcentaje de absorción aparente está inversamente correlacionada con la excreción fecal tanto en las ratas alimentadas con la leche de crecimiento con SF+AF ($r = -0,898$; $p < 0,0001$), SF+MF ($r = -0,791$; $p < 0,0001$) como en las ratas alimentadas con la leche de crecimiento con BF+AF ($r = -0,967$; $p < 0,0001$) y BF+MF ($r = -0,637$; $p < 0,0001$). Estudios de biodisponibilidad en humanos, la absorción del hierro del bisglicinato ferroso fue significativamente más elevada que la del sulfato ferroso, cuando fueron administrados juntos en una comida compuesta de maíz o harina de trigo (Bovell-Benjamin y col., 2000; Layrisse y col., 2000). Además, hay

que destacar su elevada solubilidad a pH fisiológico, favoreciendo su elevada biodisponibilidad en alimentos a pesar de la presencia de inhibidores de la absorción del hierro como el ácido fítico. Su estructura formada por un doble anillo heterocíclico restringe las reacciones con los inhibidores de la absorción del hierro, favoreciendo por tanto su biodisponibilidad (Bovell-Benjamin y col., 2000; Layrisse y col., 2000; García-Casal y Layrisse, 2001; Jeppsen, 2001). Son numerosos los estudios que aseguran que la absorción y por tanto la biodisponibilidad del bisglicinato ferroso es igual o superior a la del sulfato ferroso. En nuestro estudio, el porcentaje de la absorción del hierro del BF fue similar a la del SF, pero solamente cuando estuvo presente la fuente de folato, AF. Cuando variamos la fuente de folato a MF, el porcentaje de absorción aparente del BF disminuyó significativamente con respecto a la del SF.

4.3. Biodisponibilidad de los diferentes compuestos de hierro

La biodisponibilidad del hierro puede ser cuantificada como la cantidad de hierro adquirida por la hemoglobina durante el periodo de repleción (Anderson y col., 1972; Mahoney y col., 1974).

En la Tabla 37 se muestran los valores obtenidos de los parámetros del cálculo de la biodisponibilidad del hierro empleando la eficiencia de la regeneración de la hemoglobina (ERH): hemoglobina inicial (Hb_i), hemoglobina final (Hb_f), hierro en la hemoglobina inicial (FeHb_i), y hierro en la hemoglobina final (FeHb_f). Los niveles de hemoglobina al inicio del periodo de repleción estaban dentro del nivel de referencia que establece el método oficial de la AOAC 974.31, (< 6,0 g/dl), a excepción del grupo BF+MF (6,38 g/dl).

Tabla 37. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH) de ratas deficientes en hierro-folato alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con diferentes fuentes de hierro y folato durante 28 días

	Hb inicial	Hb final	FeHb inicial ¹	Fe Hb final ¹	ERH ²
	g/dl		mg		%
Depleción	4,37 ± 0,23	4,64 ± 0,32	1,75 ± 0,17	2,11 ± 0,20	97,30 ± 9,27
Control	11,33 ± 0,26 ^{*a}	12,40 ± 0,73 ^{*a}	4,77 ± 0,29 ^{*a}	8,18 ± 0,98 ^{*a}	39,77 ± 7,62 ^{*b}
Repleción					
SF+AF	5,40 ± 0,79 ^{*c}	12,63 ± 0,98 ^{*a}	2,16 ± 0,34 ^{/c}	7,63 ± 0,94 ^{*ab}	55,49 ± 5,71 ^{*a}
SF+MF	5,74 ± 0,70 ^{*bc}	11,05 ± 0,94 ^{*b}	2,33 ± 0,31 ^{*c}	6,84 ± 0,99 ^{*b}	48,12 ± 7,51 ^{*ab}
BF+AF	5,18 ± 0,58 ^{/c}	12,72 ± 0,56 ^{*a}	2,01 ± 0,29 ^{/c}	7,83 ± 0,53 ^{*ab}	50,03 ± 5,83 ^{*a}
BF+MF	6,38 ± 0,84 ^{*b}	11,00 ± 1,00 ^{*b}	3,13 ± 0,44 ^{*b}	6,95 ± 1,23 ^{*ab}	47,07 ± 8,90 ^{*ab}
ANOVA 2 X 2					
Fe	NS	NS	0,003	NS	NS
Folato	0,001	0,0001	0,0001	NS	NS
Fe*Folato	0,050	NS	0,0001	NS	NS

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

[/]La presencia de asteriscos indica diferencias significativas (p<0,05) con respecto al periodo de depleción.

^{/a-c}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05). NS: No Significación

¹FeHb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

²ERH (%) = [(Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100]/ Ingesta hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

El grupo control nos sirvió para comparar los resultados obtenidos frente a una situación fisiológica adecuada. Obviamente, la concentración de la hemoglobina inicial y el contenido de hierro en la hemoglobina inicial del grupo control fue significativamente superior ($p < 0,001$) al resto de los grupos. La concentración de la hemoglobina inicial en los grupos en repleción fue muy similar, salvo para el grupo BF+MF (6,38 g/dl). Este valor influyó en el contenido de hierro en la hemoglobina inicial (3,13 mg), el cual fue significativamente superior ($p < 0,05$) al resto de grupos replecionados. Si nos fijamos en los parámetros finales, y en concreto en la concentración de la hemoglobina final, los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF+MF (11,05 g/dl) y BF+MF (11,00 g/dl) fue significativamente inferior al resto de los grupos en repleción y al grupo control (12,40 g/dl). Sin embargo, esta diferencia no se vio reflejada en el contenido de hierro en la hemoglobina final, debido fundamentalmente a la ganancia de peso en estos grupos. Ambos grupos alcanzaron valores en la concentración de la hemoglobina final muy cercanos a 11,1 g/dl, límite inferior de referencia según Kaneko (1989).

Entre la ganancia de hemoglobina y ganancia de hierro en la hemoglobina, esta última es la variable que mejor refleja la regeneración de la hemoglobina, ya que tiene en cuenta las diferencias en el peso ganado y por tanto la expansión del volumen de sangre durante el periodo de repleción. De esta manera, la ganancia en peso y la ingesta de hierro estuvieron correlacionadas positivamente con la ganancia de hierro en la hemoglobina, siendo para el grupo SF+AF ($r = 0,963$; $p < 0,0001$ y $r = 0,985$; $p < 0,0001$, respectivamente), el grupo SF+MF ($r = 0,915$; $p < 0,0001$, y $r = 0,863$; $p < 0,001$, respectivamente), el grupo BF+AF ($r = 0,975$; $p < 0,001$ y $r = 0,981$; $p < 0,001$, respectivamente) y para el grupo BF+MF ($r = 0,886$; $p < 0,001$ y $r = 0,956$; $p < 0,0001$, respectivamente). Por tanto, el hierro suministrado por el BF y SF se incorporó de manera efectiva a la hemoglobina. Sin embargo, esto no significa que la biodisponibilidad de los compuestos de hierro vaya aumentando de manera paralela a la ingesta de hierro, ya que llega un momento en que la absorción del hierro mantiene constante el contenido de hierro en el organismo, y la síntesis de hemoglobina es por tanto derivada de los macrófagos del sistema reticuloendotelial mediante la ruptura de la hemoglobina presente en los eritrocitos senescentes (Miret y col., 2003). Por tanto, si el suministro de hierro a la médula ósea es insuficiente para alcanzar la demanda de la misma para la síntesis de la hemoglobina y por tanto de los eritrocitos, entonces la absorción del hierro intestinal es estimulada (Finch, 1994). En resumen, y al igual que Buchowski y col. (1989), en nuestro estudio existió una correlación inversa entre la ingesta de hierro y la eficiencia de regeneración de la hemoglobina y una correlación positiva entre el porcentaje de absorción aparente y la eficiencia de regeneración de la hemoglobina.

El porcentaje de la biodisponibilidad del hierro, expresado como ERH, para el grupo de ratas alimentadas con la leche de crecimiento enriquecida con SF+AF (55,49%), SF+MF (48,12%), BF+AF (50,03%) y BF+MF (47,07%) fue similar entre sí y en concreto, en los grupos SF+AF y BF+AF estadísticamente superiores ($p < 0,001$) al grupo control (39,77%).

Otro aspecto ha destacar en la biodisponibilidad del hierro, es el efecto del tipo de compuesto de hierro sobre la misma. Como se puede apreciar en la Tabla 37, el tipo de compuesto de hierro no tuvo ningún efecto en la biodisponibilidad del hierro, es decir, ambos compuestos de hierro se comportaron de manera similar. Del mismo modo, la biodisponibilidad del hierro tampoco se vio afectada por el tipo de compuesto de folato. Únicamente, el tipo de compuesto de hierro influyó en el contenido de hierro de la hemoglobina inicial con un nivel de significación de $p = 0,003$; siendo el grupo BF+MF el que presentó un mayor contenido al compararlo con el grupo SF+MF. No obstante, los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con MF tanto con SF como con BF, alcanzaron valores de hemoglobina significativamente inferiores ($p < 0,01$) a los grupos SF+AF y BF +AF.

4.4. Biodisponibilidad de los diferentes compuestos de folato

Numerosos investigadores (Martin, 1999; Keagy y Oace, 1982; Babu y Lakshmaiah, 1987; Clifford y col., 1990; Miller y col., 1994 a, b) aseguran que la concentración de folato en el plasma y en el hígado son buenos indicadores sensibles del estado de folatos. Además, la concentración de folatos en el eritrocito es considerado como un buen biomarcador para el estado nutricional de los folatos debido a su correlación con los folatos en el hígado, un importante órgano de almacenamiento (Wu y col., 1975). En la Tabla 38 se muestran los parámetros relacionados con el estado nutricional de los folatos tras el periodo de repleción de 28 días.

Durante el periodo de depleción, la concentración de folatos en el plasma, eritrocito y en el hígado (2,07, 840,77 nmol/l y 0,21 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo control (70,10, 1708,27 nmol/l y 1,67 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), al igual que el resto de los grupos replecionados. La concentración de folatos en el plasma del grupo en depleción (2,07 nmol/l) fue muy similar a los encontrados por House y col (2003) que variaban entre 0,8-1,9 nmol/l. Por el contrario, nuestro valor fue muy inferior a los observados en estudios previos tales como, Semchuk y col (1994), que observaron valores en la concentración de folatos en plasma de 33 nmol/l. En otro estudio, O'Leary y Sheehy (2001a) obtuvieron valores de 37 nmol/l, Huang y col. (2001) obtuvieron valores de 59,58 nmol/l en ratas alimentadas con una dieta deficiente en folato durante un periodo de 28 días.

O'Leary y Sheehy (2002) observaron valores significativamente superiores a los nuestros, siendo de 10,6 nmol/l.

Tabla 38. Estatus de folatos en ratas deficientes en hierro-folato alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con SF o BF y AF o MF durante un periodo de 28 días.

	Folatos plasma	Folatos eritrocitarios	5-MTHF en hígado
	nmol/l		µg/g
Depleción ¹	2,07 ± 0,39	840,77 ± 154,53	0,21 ± 0,02
Control ²	70,10 ± 14,78 ^{*/b}	1708,27 ± 182,01 ^{*/b}	1,67 ± 0,12 ^{*/c}
Repleción			
SF+AF	83,30 ± 7,44 ^{*/ab}	1812,70 ± 240,52 ^{*/b}	3,04 ± 0,40 ^{*/b}
SF+MF	92,24 ± 3,55 ^{*/a}	2500,85 ± 326,97 ^{*/a}	4,22 ± 0,51 ^{*/a}
BF+AF	86,60 ± 7,96 ^{*/ab}	1978,75 ± 67,28 ^{*/b}	3,27 ± 0,51 ^{*/b}
BF+MF	72,77 ± 8,22 ^{*/b}	2270,42 ± 177,51 ^{*/a}	5,07 ± 0,50 ^{*/a}
ANOVA 2 X 2			
Fe	0,007	NS	NS
Folato	NS	0,006	0,0001
FexFolato	0,0001	NS	NS

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

*La presencia de asteriscos indica diferencias significativas (p<0,05) con respecto al grupo en depleción.

^{/a-c}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

NS: No Significación

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

¹ Dieta en depleción contenía 0 µg folato/Kg dieta

² Dieta control contenía 1 mg folato/Kg dieta

En otro estudio realizado por O'Leary y Sheehy (2001b), encontraron en ratas alimentadas durante 28 días con una dieta deficiente en folatos, la concentración de folato en plasma fue del 7,48 nmol/l, significativamente superior a nuestro valor (2,07 nmol/l). Tomando como valores de referencia los obtenidos por el grupo control para la concentración de folato en el plasma, observamos claramente una mejora en las concentraciones de folato en el plasma para los cuatro grupos en repleción frente al grupo en depleción. Destacar únicamente al grupo SF+MF (92,24 nmol/l), el cual mostró una concentración de folato en el plasma significativamente superior (p<0,05) al grupo control y a su homólogo, el grupo BF+MF (72,77 nmol). En este caso, el tipo de compuesto de hierro afectó a la concentración de folato en el plasma, siendo el compuesto de hierro, SF el más adecuado.

Con respecto a la concentración de folatos en el eritrocito, está demostrado que la mayor concentración de folato se encuentra en el eritrocito mientras que en el plasma es más baja, y que prácticamente todos los folatos en el eritrocito está como 5-MTHF (Shane, 1995). La concentración de folatos en el eritrocito en las ratas alimentadas con la dieta deficiente en hierro-folato (840,77 nmol/l) fue significativamente inferior (p<0,01) a las obtenidas por el grupo control (1708,27 nmol/l), y los grupos en repleción: SF+AF (1812,70 nmol/l), SF+MF (2500,85 nmol/l), BF+AF (1978,75 nmol/l) y BF+MF (2270,42 nmol/l). No se observó ningún efecto por parte del tipo de compuesto de hierro. Sin embargo, los grupos replecionados con

la fuente de folato, MF: SF+MF y BF+MF (2500,85 y 2270,42 nmol/l, respectivamente) mostraron los valores más elevados y estadísticamente significativos ($p < 0,0001$) con respecto al resto de los grupos: control, SF+AF, y BF+AF (1708,27; 1812,70 y 1978,75 nmol/l, respectivamente). Estos resultados podrían sugerir una mayor eficacia por parte del [6S]-5-MTHF o Metafolin® frente a la del ácido fólico, que es la forma químicamente estable, oxidada y sintética de la vitamina que es empleada para la suplementación y el enriquecimiento de alimentos. Además, la fuente de folato MF, fue la que mejor biodisponibilidad mostró con respecto al AF, representada por la concentración de folato en el eritrocito. Muy pocos estudios han tratado de valorar la biodisponibilidad relativa del Metafolin® y del ácido fólico y además sus resultados son contradictorios. Uno de los principales inconvenientes encontrados en la literatura científica fue el método analítico empleado para la determinación de folato en el eritrocito, plasma o suero y en el hígado. Mientras que la mayoría de los autores emplearon el método microbiológico, en el presente estudio hemos empleado un ensayo en fase sólida, fluoroinmunométrico de tiempo resuelto, basado en la reacción de competencia entre el ácido pteroilglutámico (PGA) marcado con europio, la forma estable del folato y el folato de la muestra por un número limitado de sitios de unión en la proteína de unión al folato (PUF), descrito en la sección de Material y Métodos. Basándonos en los resultados y conclusiones planteadas por los diferentes investigadores, la administración del [6S]-5-MTHF o Metafolin®, es más eficaz que el ácido fólico en mejorar el estado de folatos en el individuo, tanto en hombres como en mujeres en edad de quedarse embarazadas y en mujeres lactantes.

Para la concentración de folatos en el hígado, únicamente el 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) se utilizó como un marcador de las reservas de folato en el hígado, debido al hecho de que ha sido demostrado ser sumamente sensible a la depleción de los folatos (Balaghi y col., 1993). Así, podemos observar que en estados de depleción la concentración del 5MTHF en el hígado fue claramente inferior ($p < 0,05$) al grupo control (1,67 $\mu\text{g/g}$). Con respecto a los grupos alimentados con la leche de crecimiento enriquecida con SF+AF/MF o BF+AF/MF, la concentración del 5MTHF en el hígado aumentó significativamente ($p < 0,0001$) tras la administración de las diferentes formas de folato. Además, alcanzaron valores estadísticamente superiores ($p < 0,0001$) al grupo control. Al igual que ocurrió con la concentración de folato en el eritrocito, donde los grupos alimentados con la leche que contenía en su composición la fuente de folato, MF alcanzaron los valores más elevados, en este caso también se observó la misma situación. Esta relación nos confirmó la correlación positiva que existe entre la concentración de folato en el eritrocito y las reservas de folato en el hígado (Philpott y col., 2001), siendo para el grupo SF+AF de $r = 0,909$, SF+MF de $r = 0,926$; BF+AF de $r = 0,945$ y BF+MF de $r = 0,961$, ambos con un nivel de significación del $p < 0,001$.

En la mayoría de los estudios realizados en ratas, la determinación de la concentración de folatos en el hígado se hizo por el método microbiológico, a través del cual el crecimiento de un microorganismo específico (*Lactobacillus casei v. rhamnosus*) se relaciona con la concentración de folato totales en el hígado. Por el contrario, el método por HPLC empleado en el presente estudio nos permitió determinar las diferentes formas derivadas de folatos presente en el hígado (Vahteristo y col.,1996; Pfeiffer y col.,1997; Konings, 1999).

4.5. Índices hematológicos y bioquímicos

Al final del periodo de depleción, se realizó la determinación de los parámetros sanguíneos de la serie roja: hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM), parámetros bioquímicos relacionados con el transporte del hierro, como el hierro sérico (HS), capacidad total de fijación del hierro (CTFH) y el porcentaje de saturación de la transferrina (%ST) y la determinación de la ferritina sérica, como indicador de las reservas de hierro corporal.

Durante la anemia deficiente en hierro, las reservas corporales de hierro se reducen, la saturación de la transferrina disminuye, la síntesis de la hemoglobina se reduce, y los eritrocitos sufren divisiones adicionales, dando lugar a la formación de eritrocitos microcíticos e hipocrómicos (Jain, 1993). Aunque las alteraciones en el metabolismo del hierro ocurren pronto en la deficiencia en hierro, los cambios morfológicos en los eritrocitos, tales como microcitosis e hipocromatosis, generalmente ocurre en los estados más avanzados de la depleción del hierro, conduciendo a la anemia deficiente en hierro (Fairbanks y Beutler, 1995). En este estudio se llevó a cabo una deficiencia moderada de folato en las ratas junto con una deficiencia de hierro. La interacción de ambos micronutrientes se centra en su importante papel en la eritropoyesis, proceso por el cual el tejido hematopoyético de la médula ósea produce las células rojas sanguíneas (eritrocitos). Junto al hierro y folato, otro micronutriente necesario para la eritropoyesis es la vitamina B12. La deficiencia de cada uno de estos micronutrientes puede conducir a un descenso en la producción de los eritrocitos y posteriormente a un descenso en el número de eritrocitos circulantes, provocando lo que se denomina una anemia (Koury y Ponka., 2004). Clínicamente, la deficiencia severa de folato produce un tipo específico de anemia, anemia megaloblástica (Lindenbaum y Allen., 1995). La anemia megaloblástica es una anemia macrocítica (tamaño de los eritrocitos elevados) y normocrómica o pseudohiperocrómica (contenido de la hemoglobina en el eritrocito es normal o elevado, respectivamente) en el que la médula ósea muestra unas anormalidades morfológicas características en los precursores de las células rojas sanguíneas. Las causas más comunes de anemia megaloblástica son la deficiencia de vitamina B12 y folato. En deficiencias moderadas y

subclínicas de estas vitaminas, habría macrocitosis sin anemia o ni macrocitosis ni anemia. En la práctica, la deficiencia de folato es asumida si un bajo nivel de folato se encuentra junto con un nivel de vitamina B12 (Wickramasinghe, 2006).

Como se ha comentado anteriormente, la macrocitosis es un aumento en el tamaño de las células rojas sanguíneas que puede afectar a todas las células o solamente a una proporción de las mismas. Las células rojas más jóvenes, que aparecen en la sangre cuando hay una velocidad de renovación elevada, son más grandes y puede resultar en un elevado Volumen Corpuscular Medio (VCM). Debido a que las células son más grandes, la Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) a menudo se ve afectada, estando aumentada en estos casos (Wickramasinghe, 2006). En individuos con una deficiencia en folato, el VCM tiende a aumentar antes de que el nivel de hemoglobina descienda significativamente (Lindenbaum y Allen., 1995; Sant y col., 1997). Sin embargo, incluso cuando hay evidencias bioquímicas de la deficiencia de esta vitamina, el VCM a menudo permanece dentro del rango de referencia (Seward y col., 1990), especialmente si coexiste con una deficiencia en hierro o talasemia.

Otro de los parámetros utilizados para poder mejorar el diagnóstico de las diferentes anemias es el índice de distribución de los glóbulos rojos, en inglés, RDW (Red cell Distribution Width). Este parámetro es un indicador de la variación del tamaño de los eritrocitos (anisocitosis). Valores de RDW bajos o normales indican generalmente una población homogénea en el tamaño de los eritrocitos, sin embargo, valores elevados muestran una población heterogénea directamente relacionada con el grado de anisocitosis. Existen evidencias de que el RDW en la mayoría de los casos sería útil para detectar estados tempranos de deficiencia de hierro (Mahu y col., 1990; Lin y col., 1992) en conjunción con otros estudios más específicos como la ferritina sérica (Van Zeben y col., 1990). Así, un incremento en el RDW sería indicativo de una deficiencia nutricional precoz, especialmente con respecto al hierro (Roberts y col., 1985). También el RDW sería útil en la diferenciación de las anemias microcíticas hipocrómicas como es la anemia por deficiencia en hierro, donde el volumen corpuscular medio (VCM) estaría disminuido y un RDW muy aumentado. Estudios realizados por Bessman y col. (1983), demostraron que los incrementos en el valor del RDW no sólo sería útil para la deficiencia nutricional del hierro, sino también de otras deficiencias nutricionales como las del ácido fólico o vitamina B12 que conducen a una anemia macrocítica o anemia megaloblástica (Harkins y col., 1994).

Desde el punto de vista hematológico, la coexistencia de dos deficiencias podría alterar los valores hematológicos, por este motivo vamos a describir como se comporta cada parámetro desde un estado de deficiencia hasta un estado de repleción, estableciendo como valores normales los obtenidos por el grupo control. En el grupo en depleción, tanto la

hemoglobina (descrita en el apartado anterior), el VCM, HCM y CHCM están disminuidas (Figura 34 a, b y c), situación que tiene lugar en una anemia deficiencia en hierro, caracterizada por una anemia microcítica e hipocrómica. Estos valores nos permiten descartar una posible anemia megaloblástica, caracterizada por un VCM elevado. El índice de distribución de los glóbulos rojos en el grupo control fue de 24,9%, al no tener valores de referencia tomaremos como referencia los valores obtenidos en nuestro grupo control. La RDW del grupo en depleción (31,7%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo control, debido a la mezcla de microcitos y normocitos en la circulación sanguínea. Si continuara la deficiencia de estos micronutrientes, la hemoglobina seguiría disminuyendo y el RDW aumentando hasta que todas las células normales formadas antes de la deficiencia hayan sido eliminadas de la circulación, que en el caso de los humanos es de 120 días. Mientras tanto, habría una población homogénea de células rojas anormales, la hemoglobina se estabilizaría y el RDW alcanzaría valores normales. Cuando se restablece la incorporación en la dieta de los dos micronutrientes, en la circulación sanguínea coexistiría tanto células rojas normales como células rojas anormales, y el RDW aumentaría de nuevo a niveles anormales, hasta que los microcitos formados durante el periodo de deficiencia alcance el final de su vida media (la vida media estimada de las células rojas sanguíneas en la rata es alrededor de 60 días (Belcher y Harriss, 1959). Los valores del RDW para los grupos SF+AF (33,03%), SF+MF (28,08%), BF+AF (27,60%), y BF+MF (35,05%) fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo control (24,9%). Esta situación nos confirma la presencia de microcitos (una vez descartado la presencia de macrocitos, por tener un VCM bajo) y células rojas normales en la circulación sanguínea, además, no se alcanzaría una situación normal hasta que finalizara la vida media de los microcitos.

En la Figura 34 a, se observa que el VCM de los grupos en repleción aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo en depleción. La figura está representada en un histograma de acumulación, donde en los grupos en repleción y control se tomaron como base el valor del grupo en depleción más el valor acumulativo con respecto al grupo en depleción, separado por una línea blanca. El grupo BF+AF ($54,92 \mu\text{m}^3$) fue el único grupo que alcanzó los valores más elevados con respecto al resto de los grupos y al grupo control. Por el contrario, el grupo BF+MF ($43,67 \mu\text{m}^3$) alcanzó un valor significativamente inferior ($p < 0,05$) al resto de grupos, excepto al grupo control. En general, en todos los casos el VCM se encontró dentro del rango normal ($44-69 \mu\text{m}^3$), salvo el grupo en depleción.

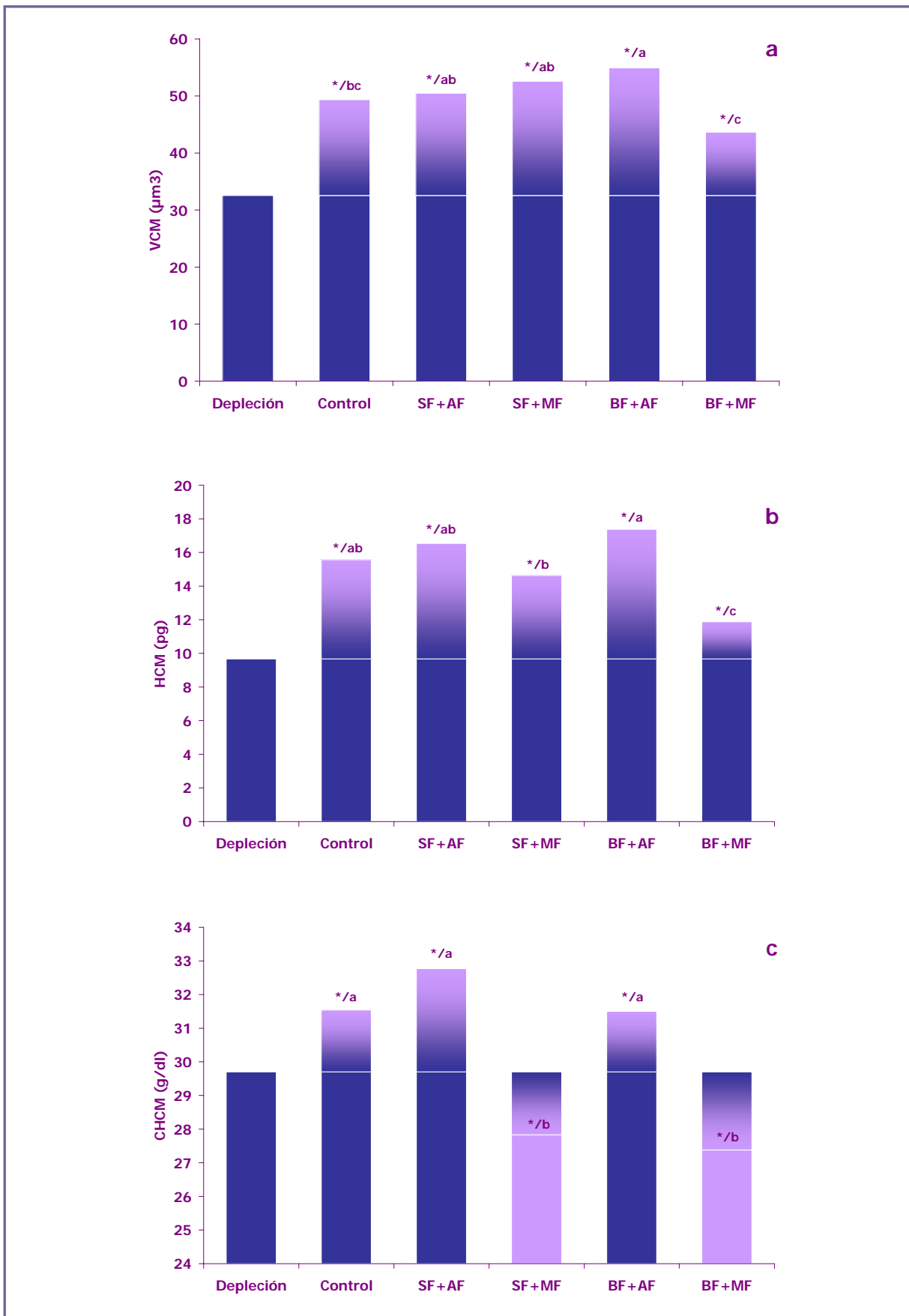


Figura 34. Incremento en las concentraciones de VCM (a), HCM (b) y CHCM (c), en ratas deficientes de hierro-folato durante la administración de los diferentes compuestos de hierro (SF y BF) y folato (AF y MF).

^{*}Indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo en depleción.

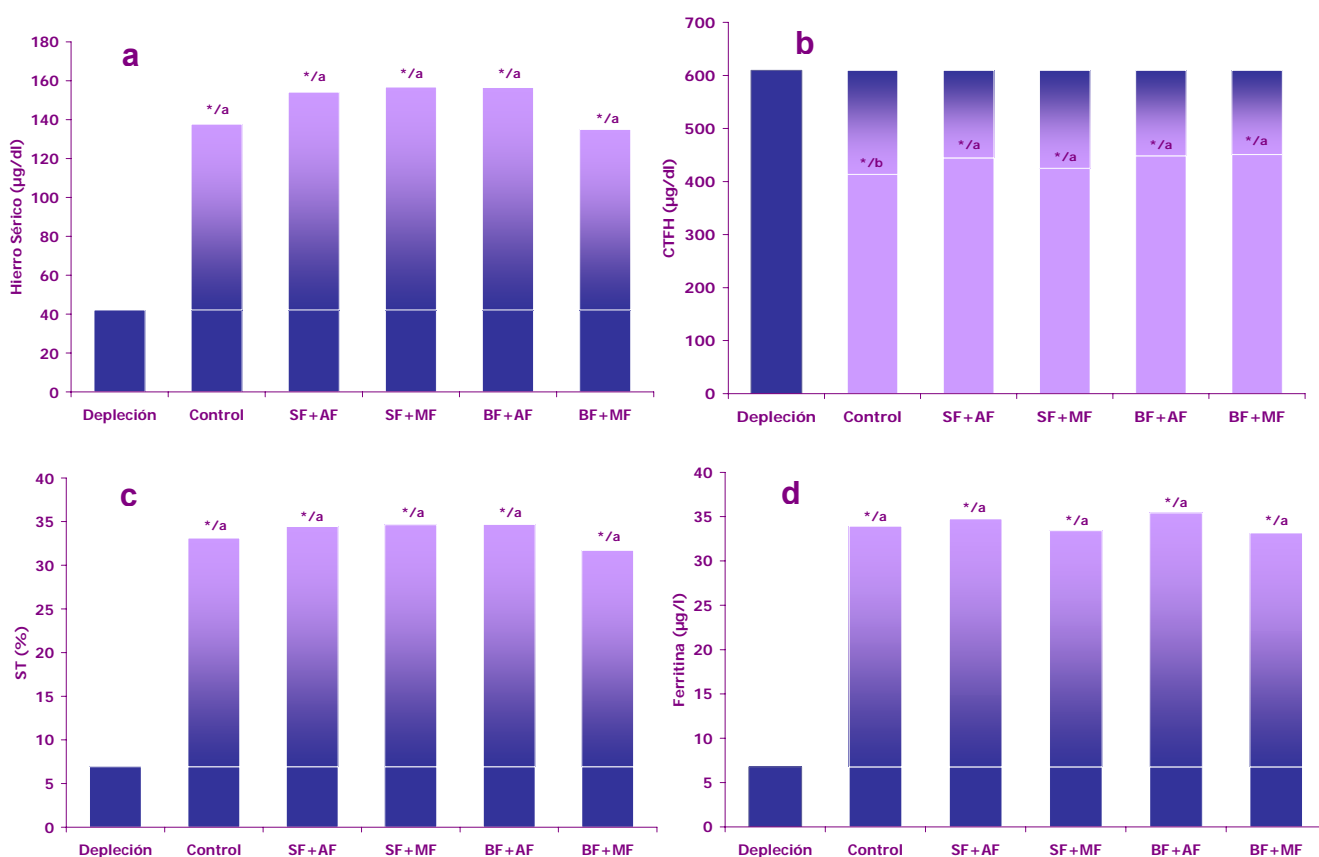
^{/a-c}Indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los demás grupos.

El contenido de hemoglobina en el eritrocito, representado como la HCM (Figura 34 b) y la CHCM (Figura 34 c) que corresponde a la concentración de hemoglobina en un volumen de eritrocitos, fue para el grupo en depleción (9,67 pg y 29,70 g/dl, respectivamente) significativamente inferior ($p < 0,001$) al resto de los grupos en repleción y control. La disminución de ambos parámetros tiene lugar por una deficiencia de hierro, y da lugar a la aparición de eritrocitos poco teñidos con un contenido de hemoglobina reducido (eritrocitos hipocrómicos). Finalizado el periodo de repleción, los niveles de HCM para los grupos SF+AF, SF+MF y BF+AF (16,54; 14,63 y 17,38 pg, respectivamente) fueron significativamente superiores ($p < 0,01$) al grupo en control (15,57 pg). Por el contrario, el grupo BF+MF (11,88 pg) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo control y al resto de los grupos en repleción, aunque su valor estaba dentro rango normal (12-24,5 pg). En el caso de la CHCM, observamos que salvo los grupos SF+AF, BF+AF y control (32,77; 31,50 y 31,54 g/dl, respectivamente) con valores normales, el resto de los grupos, SF+MF y BF+MF (27,83 y 27,38 g/dl, respectivamente) mostraron valores significativamente inferiores al grupo control y al resto de los grupos. En general, la combinación BF+MF proporcionó los valores más bajos para los parámetros VCM y HCM. Por el contrario, para la CHCM se observó un claro efecto según el tipo de compuesto de folato, siendo el MF junto con los diferentes compuestos de hierro, los que mostraron los valores más bajos.

Otro de los indicadores empleados para la evaluación de la anemia, fue la determinación del hierro sérico (HS), capacidad total de fijación del hierro (CTFH) y la saturación de la transferrina (%ST). El hierro sérico y la capacidad total de fijación del hierro son parámetros que se relacionan con el intercambio de hierro entre el sistema reticuloendotelial y la médula ósea. La transferrina es la principal proteína relacionada con el transporte de hierro en la sangre. Como consecuencia de ello, el contenido de hierro en el suero refleja el número de átomos de hierro unidos a la transferrina. Estos tres parámetros son particularmente útiles para diferenciar los estados deficitarios de hierro por causas nutricionales de aquellos que son consecuencia de diferentes patologías asociadas a procesos de infección e inflamación crónicos (Boccio y col., 2003). Durante la eritropoyesis deficiente en hierro tiene lugar una restricción en el suministro del hierro a las células rojas en desarrollo, traduciéndose en una disminución del hierro sérico y un aumento de la transferrina, lo que determina que exista una reducción en la saturación de la transferrina. Además, son útiles para el diagnóstico clínico de la anemia deficiente en hierro y las enfermedades inflamatorias crónicas (Huebers y col., 1987; Fairbanks y Klee., 1994). Generalmente, la transferrina está saturada aproximadamente en un 30%, y niveles $< 16\%$ son indicativos de una deficiencia en hierro. Por el contrario, niveles $> 60\%$ son indicativos de una sobrecarga de hierro asociada a la hemocromatosis hereditaria. La ferritina sérica está directamente relacionada con el contenido de hierro de los depósitos, principalmente el hígado. Existe una relación entre el

contenido de hierro de los depósitos y las concentraciones séricas de la ferritina. Así, aproximadamente unos 8-10 mg de hierro en los depósitos es equivalente a 1 µg/l de ferritina sérica. Diferentes factores como la infección aguda o crónica, deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico, consumo excesivo de alcohol, leucemia, enfermedades hepáticas, etc., producen un aumento significativo de este parámetro. Sin embargo, los valores bajos de ferritina sérica <12 µg/l, están asociados a un déficit de hierro en los depósitos (Boccio y col., 2003).

La Figura 35 (a, b, c y d), representan los valores medios de HS, CTFH, %ST y ferritina sérica respectivamente, al final del periodo de depleción, repleción y grupo control. Los niveles de HS, ST y ferritina para el grupo en depleción fueron significativamente inferiores ($p < 0,01$) a cada uno de los grupos en repleción y al grupo control. Por el contrario, la CTFH se mostró elevada al final del periodo de depleción y significativamente superior ($p < 0,01$) al resto de los grupos.



Figuras 35. Efecto de la ingesta de la leche de crecimiento enriquecida con SF+AF/ BF o BF+AF/MF, sobre el HS (a), CTFH (b), ST (c) y Ferritina (d), en ratas deficientes en hierro-folato durante un periodo de 28 días.

*Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo en depleción.

/a-b) Indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al resto de grupos.

La concentración de hierro sérico (Figura 35 a) en los grupos en repleción y control, aumentó significativamente con respecto al grupo en depleción, no mostrando diferencias

significativas entre ellos. La misma situación la observamos en el resto de parámetros, CTFH, ST y ferritina (Figuras 35 b, c y d). En estos casos, hubo un aumento durante el periodo de repleción, a excepción de la CTFH, donde la tendencia fue a disminuir, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en repleción y el grupo control, para las variables HS, ST y ferritina.

A pesar de las diferencias encontradas en los parámetros sanguíneos de la serie roja y en concreto por parte del grupo BF+MF, no se observaron diferencias en los parámetros relacionados con el transporte del hierro (HS, CTFH y ST). Existe un intercambio permanente de hierro entre la transferrina y los depósitos de hierro, formados por la ferritina y la hemosiderina. Cuando hay una elevada ingesta de hierro, la transferrina transporta una cantidad significativa de hierro a los órganos de depósitos. Por el contrario, cuando hay una demanda de hierro (ingesta de hierro insuficiente), la transferrina toma el hierro de los depósitos para transferirlo a dicho tejido que se encuentra sin depósitos (Huebers y Finch, 1984; Cazzola, y col., 1985). En resumen, existe una correlación positiva entre el transporte del hierro (medido como el porcentaje de saturación de la transferrina) y los depósitos del mismo (medidos como ferritina). En nuestro caso, observamos una situación similar para el grupo SF+AF ($r = 0,958$); el grupo AF+MF ($r = 0,974$); el grupo BF+AF ($r = 0,968$) y para el grupo BF+MF ($r = 0,970$), todos ellos con un nivel de significación de $p < 0,001$. De igual modo, existe una relación inversa entre la absorción del hierro y las reservas de hierro corporales, esta situación se debe a que en estados de deficiencia en hierro las reservas de hierro disminuyen como consecuencia de un déficit en la ingesta de hierro. Esto conlleva a que exista un aumento en la producción de la transferrina (niveles de CTFH) para transportar el hierro, pero como no hay una ingesta adecuada el hierro lo adquiere de las reservas de hierro (ferritina), para transportarlas hasta la médula ósea donde tiene lugar la eritropoyesis en su mayor parte. En nuestro caso observamos una correlación inversa entre la absorción del hierro (AA) y las reservas corporales de hierro (ferritina) en todos los grupos, siendo para el grupo SF+AF de $r = -0,727$; grupo SF+MF de $r = -0,791$; grupo BF+AF de $r = -0,778$ y por último el grupo BF+MF de $r = -0,919$; todos ellos con un nivel de significación del $p < 0,001$.

4.6. Almacenamiento del hierro

Una vez establecida la deficiencia de hierro-folato en ratas y analizados todos los parámetros relacionados con la absorción y biodisponibilidad de ambos micronutrientes, y su interacción entre ellos, quedaría por observar si la repleción de las reservas de hierro alcanzaron sus concentraciones adecuadas en comparación al grupo control, y si la repleción de folato afectó o no a la concentración de hierro en los órganos. En general, la

concentración de hierro en el hígado y en menor medida en el bazo ha sido rutinariamente utilizada como indicadores del estado del hierro en ratas (Park y col., 1987; Fairweather-Tait y col., 1991; Whittaker y col., 1996 y 1997; Fisher y col., 2002).

En la Tabla 39 se muestran las concentraciones de hierro total en las diferentes piezas anatómicas en ratas alimentadas con una leche de crecimiento enriquecida con SF+AF/MF o BF+AF/MF durante el periodo de repleción de 28 días. Las reservas de hierro disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) en el grupo en depleción con respecto al grupo control, en cada uno de los órganos analizados. El hígado es el principal órgano de reserva tanto del hierro como de los folatos. La concentración de folato en el hígado ya ha sido discutida previamente en este estudio. Con respecto a la concentración de hierro, podemos observar que salvo el grupo SF+MF (0,98 mg/g), todos los demás grupos alcanzaron concentraciones de hierro en el hígado similares al grupo control. No se observó ningún efecto por parte del tipo de compuesto de hierro ni del tipo de compuesto de folato, en la repleción de la concentración de hierro en el hígado. La misma situación la encontramos en la concentración de hierro en el bazo, donde el grupo SF+MF (0,49 mg/g) mostró valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) al resto de los grupos. Tampoco existió un efecto según el tipo de compuesto de hierro ni el tipo de compuesto de folato.

Tabla 39. Concentración de hierro en diferentes piezas anatómicas de las ratas alimentadas con una leche de crecimiento líquida enriquecida con SF+AF/MF o BF+AF/MF. Los resultados se expresan en mg/g peso seco.

	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Depleción¹	0,53 ± 0,07	0,36 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Control²	1,31 ± 0,28 ^{*a}	0,57 ± 0,19 ^{*ab}	0,21 ± 0,07 [*]	0,26 ± 0,03 [*]	0,06 ± 0,01 [*]
Repleción					
SF+AF	1,33 ± 0,33 ^{*a}	0,57 ± 0,12 ^{*ab}	0,25 ± 0,08 [*]	0,24 ± 0,02 [*]	0,06 ± 0,01 [*]
SF+MF	0,98 ± 0,11 ^{*b}	0,49 ± 0,07 ^{*b}	0,25 ± 0,09 [*]	0,21 ± 0,03 [*]	0,04 ± 0,01 [*]
BF+AF	1,43 ± 0,22 ^{*a}	0,65 ± 0,05 ^{*a}	0,37 ± 0,13 [*]	0,30 ± 0,07 [*]	0,07 ± 0,02 [*]
BF+MF	1,02 ± 0,19 ^{*a}	0,55 ± 0,08 ^{*ab}	0,22 ± 0,07 [*]	0,20 ± 0,09 [*]	0,06 ± 0,01 [*]
ANOVA 2X2					
Fe	NS	NS	NS	NS	NS
Folato	NS	NS	NS	NS	NS
FexFolato	NS	NS	NS	NS	NS

Cada valor representa la media ± desviación típica, n=12

*La presencia de asteriscos indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo en depleción.

^{a-c}Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

NS: No Significación

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

¹ Dieta en depleción contenía 0 µg folato/Kg dieta

² Dieta control contenía 1 mg folato/Kg dieta

En el resto de los órganos analizados, riñón, corazón e intestino delgado, todos los grupos en repleción: SF+AF, SF+MF, BF+AF, BF+MF y el grupo control, mostraron valores similares entre sí y significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo en depleción. Se sabe que la concentración de ferritina está directamente relacionada con las reservas de hierro en

el organismo. Estos resultados nos confirman los valores obtenidos de ferritina en suero, estando relacionados ambos parámetros. En general, no se observó ningún efecto en la repleción de las reservas de hierro, por parte de los compuestos de hierro y de folato administrados a las ratas a través de una leche de crecimiento.

CONCLUSIONES

Conclusiones del primer objetivo:

1.1. La concentración de la mayoría de las vitaminas hidrosolubles presentes en la leche de crecimiento líquida mostraron un comportamiento muy inestable a lo largo de su vida comercial, siendo las pérdidas más acusadas durante el almacenamiento a 37° C. Únicamente, las vitaminas B5 y B9 mostraron una buena estabilidad a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas. La estabilidad de las vitaminas liposolubles en la leche de crecimiento líquida fue muy baja, estando afectada tanto por el tiempo como por la temperatura de almacenamiento, alcanzando las mayores pérdidas a los 9 meses y a 37° C de temperatura.

1.2. La cinética de degradación de las vitaminas estudiadas en la leche de crecimiento líquida se ajustan a modelos tanto de orden cero como de orden uno. El elemento clave en estas ecuaciones es la energía de activación (E_a), siendo la vitamina D la más lábil, seguida por la vitamina E, Biotina, A y C. Se han desarrollado ecuaciones simplificadas que permiten la misma evaluación y que se relacionan correctamente con la ecuación de Arrhenius para cada vitamina. Estas ecuaciones permiten predecir el tiempo en el cual se produce una pérdida del 50% de la concentración inicial de las vitaminas en función de la temperatura de almacenamiento.

Conclusiones del segundo objetivo:

2.1. La bioaccesibilidad del [6S]-5-MTHF fue ligeramente inferior a la del ácido fólico en la leche de crecimiento líquida. De cara a la maduración metabólica del niño de corta edad, el uso del [6S]-5-MTHF frente al ácido fólico favorece la expresión de las enzimas necesarias para la obtención de grupos metilados en el ciclo de la síntesis de bases púricas y pirimidínicas.

Conclusiones del tercer objetivo:

3.1. La biodisponibilidad y absorción del hierro en la leche de crecimiento líquida procedente del enriquecimiento con Bisglicinato Ferroso, fue equivalente a la del enriquecimiento con Sulfato Ferroso tras someter a las ratas a un modelo de depleción-repleción del hierro. El efecto metabólico del hierro en ambos compuestos, se comprobó mediante la recuperación de los parámetros hematológicos y bioquímicos en el mismo tiempo respecto a un estado de anemia deficiente en hierro.

Conclusiones del cuarto objetivo:

4.1. La incorporación del [6S]-5-MTHF a la leche de crecimiento líquida aumenta de manera significativa la concentración de folato en hígado y eritrocitos en ratas, en comparación al ácido fólico, en un ensayo de depleción-repleción de folato.

4.2. El tipo de compuesto de folato no afectó a la absorción ni a la biodisponibilidad del Sulfato Ferroso y Bisglicinato Ferroso incorporados a la leche de crecimiento líquida. Los parámetros relacionados con el transporte y el almacenamiento del hierro (Hierro sérico, Capacidad total de fijación del hierro, Saturación de la transferrina y Ferritina) no se vieron afectados por el tipo de compuesto de hierro ni de folato. En relación a los parámetros hematológicos indicadores de la formación de glóbulos rojos normales (Hemoglobina, Volumen corpuscular medio y Hemoglobina corpuscular media), el ácido fólico es el más eficaz en combinación con el Bisglicinato Ferroso.

RESUMEN

Las leches de crecimiento, *junior* o leches 3 son fórmulas de continuación modificadas parcialmente. No existen unas recomendaciones exclusivas para la formulación de estas leches ni tampoco una legislación específica, por lo que la industria alimentaria se ajusta a las recomendaciones existentes para las fórmulas de continuación y a los estudios sobre nuevos factores nutricionales que se van realizando y de los que se infieren recomendaciones del producto (Ferrer-Lorente y Dalmau-Serra, 2005).

Dos de los desordenes nutricionales más comunes en todo el mundo, y que a menudo ocurren simultáneamente, son la deficiencia en hierro y folato. Así, la estabilidad, biodisponibilidad y funcionalidad del bisglicinato ferroso y del [6S]-5-MTHF o Metafolin[®] usados como suplementos en la alimentación infantil, centran el desarrollo de este trabajo. El procesado de los alimentos y los largos periodos de almacenamiento de los mismos pueden conducir a las pérdidas de las vitaminas. El primer objetivo del presente estudio fue valorar la estabilidad de las vitaminas presentes en una leche de crecimiento líquida durante su vida comercial y almacenada a diferentes temperaturas (23, 30 y 37° C). Tras 9 meses de almacenamiento, las vitaminas B5 y B9 fueron las únicas que permanecieron estables independientemente de la temperatura de almacenamiento. El resto de las vitaminas hidrosolubles mostraron pérdidas a lo largo de tiempo, siendo éstas mayores a 37° C, a excepción de la vitamina B6, que presentó las mayores pérdidas a los 23° C. Las vitaminas liposolubles (A, D y E) se mantuvieron estables entre el segundo y tercer mes de almacenamiento, a partir de ahí, su concentración descendió, especialmente a los nueve meses y los 37° C. Posteriormente, las vitaminas C, B8, A, D y E se seleccionaron para conocer sus parámetros cinéticos de degradación. La velocidad de reacción era más elevada a medida que aumentaba la temperatura de almacenamiento, observándose las mayores pérdidas a los 37° C. Una mayor vida media de degradación en cada una de las vitaminas analizadas se alcanzó durante el almacenamiento de las leches a 23° C. Se han desarrollado modelos cinéticos tanto de orden cero como de orden uno, que representan la evolución de las vitaminas C, B8, A, D y E en las diferentes temperaturas de almacenamiento, así como sus correspondientes coeficientes de correlación. Del mismo modo, se ha establecido una expresión que representa el contenido de las vitaminas como una función del tiempo y de la temperatura.

El siguiente objetivo fue estudiar la bioaccesibilidad de la forma sintética Metafolin[®] frente al ácido fólico comúnmente empleado en la suplementación y enriquecimiento de los alimentos. Para ello se empleó un modelo gastrointestinal dinámico *in vitro* controlado por ordenador, conocido como (TIM[®] Model). La bioaccesibilidad de folato corresponde a la fracción del mismo que liberada de la matriz del alimento y está disponible para la absorción

en el intestino delgado. Los resultados indicaron que la fracción bioaccesible de la leche enriquecida con Metafolin® (66,78 %) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a la del ácido fólico (73,86%). Sin embargo, numerosos estudios avalan al Metafolin® como una alternativa al uso del ácido fólico en el enriquecimiento o suplementación.

A continuación se evaluó el comportamiento del bisglicinato ferroso añadido a la leche de crecimiento líquida, mediante un modelo de repleción de la hemoglobina en ratas anémicas. Diversos parámetros hematológicos y bioquímicos fueron evaluados con el objetivo de confirmar la recuperación del estado de anemia por deficiencia en hierro. Los resultados confirman que el bisglicinato ferroso mostró una absorción y biodisponibilidad similar a la del sulfato ferroso, compuesto de hierro de referencia. Además, los valores de los parámetros hematológicos y bioquímicos confirmaron una clara recuperación de una anemia deficiente en hierro en ratas, siendo el bisglicinato ferroso un compuesto de hierro ideal para el enriquecimiento de la leche de crecimiento líquida.

Finalmente, se desarrolló un estudio de depleción-repleción en ratas deficientes en hierro y folato con el fin de investigar una posible interrelación entre ambos compuestos. Además, se evaluó la biodisponibilidad de las dos formas de folato (Metafolin® y Ácido Fólico) mediante la concentración de folatos en plasma, eritrocitos e hígado. Los resultados indicaron que la biodisponibilidad del Metafolin® fue significativamente superior a la del ácido fólico. Sin embargo, la absorción del hierro se vio afectada tanto por el tipo de compuesto de hierro empleado (Bisglicinato Ferroso o Sulfato Ferroso) como por el tipo de folato, siendo la combinación Bisglicinato Ferroso + Metafolin® la que mostró una absorción más baja frente al resto de los grupos analizados. En cuanto a la biodisponibilidad del hierro, observamos que ésta no estuvo afectada ni por el tipo de hierro ni por el tipo de folato. Los parámetros hematológicos (Hemoglobina, Volumen corpuscular medio y Hemoglobina corpuscular media) decrecieron por el empleo de Metafolin®. Mientras que los parámetros relacionados con el transporte y almacenamiento del hierro (Hierro sérico, Capacidad total de fijación del hierro, Saturación de la transferrina y Ferritina) no se vieron afectados por ninguno de los compuestos de hierro ni de folato.

En resumen, desde el punto metabólico, el Bisglicinato Ferroso fue equivalente al Sulfato Ferroso, no estando afectado por la presencia de Metafolin® o Ácido Fólico en la leche de crecimiento. Sin embargo, desde el punto de vista hematológico, el Bisglicinato Ferroso en combinación con el ácido fólico favoreció la formación de los glóbulos rojos, tras someter a las ratas a un ensayo de depleción-repleción de hierro y folato.

SUMMARY

Growing-up milks are partially modified follow-up formulas. Neither recommendations nor specific legislation exist for their formulation. Therefore, food industry uses the recommendations established for follow-up formulas and those obtained from scientific studies carried out on new nutrients when elaborating growing-up milks (Ferrer-Lorente y Dalmau-Serra, 2005).

Two most of the most important worldwide nutritional disorders that commonly come together are iron and folate deficiencies. Thus, the stability, bioavailability and functionality of Ferrous Bisglycinate and [6S]-5-methyltetrahydrofolate or Metafolin[®] employed as supplements in infant food, focus the development of this work. Food processing and long storage time may lead to vitamins losses. The first goal of the present investigation was to assess the stability of the vitamins present in a growing-up liquid milk during its shelf-life and storage at different temperatures (23, 30 and 37° C). After 9 months of storage, only vitamins B5 and B9 remained stable regardless the storage temperature. The rest of the water-soluble vitamins showed losses along storage time, especially at 37° C. The exception was vitamin B6, which mainly decreased when the product was stored at 23° C. Fat-soluble vitamins (A, D and E), remained unchanged between the second and third month of storage. However, their concentration decreased especially in the ninth month at 37° C. Then, vitamins C, B8, A, D and E were selected to establish their degradation kinetic parameters. The velocity of the reaction was higher as the storage temperature increased, thus larger losses were found at 37° C. The longer half-life ($t_{1/2}$) of every vitamin degradation was achieved when samples were stored at 23° C. Both zero- and first-order kinetic models and their correlation factors were developed in order to depict the evolution of vitamins C, B8, A, D and E at different storage temperature. Likewise, a mathematical expression was established to represent the vitamins' content as a function of time and temperature.

The next aim of this work was to study the bioaccessibility of the synthetic folate Metafolin[®] compared to folic acid, commonly used as food supplement. A dynamic gastrointestinal model (TIM[®] Model) computer-controlled was used. The bioaccessibility of folate corresponds to the fraction that is released from the food matrix and it is available for its absorption in the small intestine. The bioaccessible fraction of Metafolin[®]-fortified growing-up milk (66,78%) was significantly lower than that of Folic Acid-fortified growing-up milk (73,86%).

Then, the effect of Ferrous Bisglycinate added to a growing-up liquid milk using a haemoglobin repletion model in anaemic rats was investigated. A number of plasmatic and biochemical parameters were evaluated in order to confirm rats recovery from iron deficiency anemia. The results showed that absorption and bioavailability of ferrous bisglycinate was as

good as that of Ferrous Sulfate, considered as the reference iron compound. In addition, plasmatic and biochemical values confirmed a solid recovery of rats from the iron deficiency anaemia.

Finally, we set up a depletion-repletion experiment using iron and folate deficient rats to study the interrelationship between both compounds. In addition, the bioavailability of Metafolin[®] and Folic Acid was determined by the folate concentration in plasma, red cells and liver. The results indicated that Metafolin[®] bioavailability was significantly higher than that of Folic Acid. However, iron absorption was affected by both the type of iron compound (Ferrous Bisglycinate and Ferrous Sulfate) and the synthetic folate present in the growing-up milk. Thus, the combination Ferrous Bisglycinate + Metafolin[®] showed the lowest iron absorption in comparison to the rest of combinations analyzed. On the other hand, iron bioavailability was not influenced by neither the type of iron compound nor the folate form. Plasmatic parameters (Haemoglobin, Mean Corpuscular Volume, Mean Corpuscular Haemoglobin) decreased by the use of Metafolin[®]. Whereas parameters related to iron transport and storage (Serum Iron, Total Iron Binding Capacity, Transferrin Saturation and Ferritin) were not affected by any of the iron and folate compounds.

In summary, Ferrous Bisglycinate was equivalent to Ferrous Sulfate from a metabolic standpoint, not being affected by the presence of Metafolin[®] or Folic Acid in the growing-up milk. However from a haematological point of view, Ferrous Bisglycinate combined with Folic Acid enhanced red cells production in rats subjected to a depletion-repletion assay for both iron and folate.

BIBLIOGRAFÍA

- AAP. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. 1999.** Iron fortification of infant formulas. *Pediatrics*. 104: 119-123.
- Abboud, S., Haile, D.J. 2000.** A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 275: 19906-19912.
- Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Mariné-Font, A. 1997.** Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 778: 247-253.
- Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M.T., Riera-Valls, E., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C. 2000a.** Stability of vitamins during the storage of liquid infant milks. *Journal of Dairy Research*. 67: 225-231.
- Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Valverde, M.C., Mariné-Font, A. 2000b.** Stability of vitamins A, E y B complex in infant milks claimed to have equal final composition in liquid and powdered form. *J. Food Sci.* 65(6): 1052-1055.
- Albalá-Hurtado, S., Veneciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., Riera-Valls, E., Mariné-Font, A. 2000c.** Stability of vitamins during the storage of liquid infant milks. *J. Dairy Res.* 67: 225-231.
- Allen, L.H. 1995.** Malnutrition and human function: a comparison of conclusions from the INCAP and nutrition CRSP studies. *J. Nutr.* 125 (Suppl. 4): 1119S-1126S.
- Allen, L.H. 1998.** Properties of iron amino acid chelates as iron fortificants for maize. *Proceeding of the Albion Laboratories, Inc., International Conference on Human Nutrition*, pp. 96-108. Jan 24,25, Salt Lake City, UT.
- Allen L.H. 2000.** Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr*; 71:1280S-4S.
- Allen, C., Parks, O.W. 1979.** Photodegradation of riboflavin to lumichrome in milk exposed to sunlight. *J. Dairy Sci.* 60: 1038-1041.
- Allen, L. H. 1993.** The nutrition CRSP: what is marginal malnutrition, and does it affect human function?. *Nutr. Rev.* 51: 255-267.
- Allen, L. H. 1994.** Vitamin B₁₂ metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. In: Allen, L.H., Lonnerdal, B, eds. *Nutrient Regulation During Pregnancy, Lactation, and Infant Growth*. New York: Plenum Press; 173-186.
- Allen, L. H. 2002.** Iron Supplements: Scientific Issues Concerning Efficacy and Implications for Research and Programs. *J. Nutr.* 132: 813S-819S.
- Allen, L.H. 2002.** Advantages and limitations of iron amino acid chelates as iron fortificants. *Nutr. Rev.* 60: 18-21.
- Allen, L. H., Backstrand, J. R., Chavez, A., Pelto, G. H. 1992.** Functional Implications of Malnutrition. Mexico Project Final Report. Storrs, CT: University of Connecticut.
- Allen, L. H., Casterline-Sabel, J. 2001.** Prevalence and causes of nutritional anemias. In *Nutritional Anemias*, pp. 7-21. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Allen, L.H., Ahluvalia, N. 1997.** Improving iron status through diet: the application of knowledge concerning dietary iron in human populations. Washington, DC: US Agency for International Development and Opportunities for Micronutrient Interventions.
- Alm, B., Wennergren, G., Norvenius, S.G., y col. 2002.** Breast feeding and the sudden infant death syndrome in Scandinavia, 1992–95. *Arch Dis Child.* 86 :400 –402
- Almaas, KR.T., Rootwelt, S., Oyasaeter,S., Saugstad, O.D. 1997.** Ascorbic acid enhances hydroxyl formation in iron-fortified infant cereals and infant formulas. *Eur. J. Pediatr.* 155: 148-152.
- Alvarado, J.D., Viteri, N.P. 1989.** Efecto de la temperatura sobre la degradación aeróbica de la vitamina C en jugos de frutas cítricas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 39 (4): 601-612.
- American Academy of Paediatrics Committee on Nutrition (AAP). 2004.** *Pediatric Nutrition Handbook*. Fifth.

- American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. 2003.** Prevention of pediatric overweight and obesity. *Pediatrics*. 112 :424 –430
- Andago, P.E., Osendarp, S.J., Ayah, E., y col. 2007.** Efficacy of iron fortified whole maize flour on iron status of schoolchildren in Kenya: a randomised controlled trial. *Lancet*. 369: 1799-1806.
- Anderson, T.A., Kim, I., Fomon, S.J. 1972.** Iron status of anemic rats fed iron-fortified cereal-milk diets. *Nutr. Metabol.* 14: 355-361.
- Andrews, N.C., 1999a.** Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341, 1986-1995.
- Andrews, N.C., 1999b.** The iron transporter DMT1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 991-994.
- Andrews, N.C., 2005.** Molecular control of iron metabolism. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 18 (2), 159-169.
- Angulo-Kinzler RM, Peirano P, Lozoff B. 2002.** Spontaneous motor activity in human infants with iron-deficiency anemia. *Early Hum Dev*; 66:67-79.
- Antony, A. C. 1991.** Megaloblastic anemias. In: Hoffman, R., Benz, E. J., Shattil, S. J., y col., eds. *Hematology: Basic Principles and Practice.* New York: Churchill Livingstone; 392-422.
- AOAC. 1990.** Bioavailability of iron. Rat Hemoglobin Repletion Bioassay. In: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* 15th ed.; Helrich K, (ed) Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington, VA, 16. 1098-1099.
- AOAC. 1998.** Official Method 974.31. Bioavailability of iron. Rat Hemoglobin Repletion Bioassay.
- Arabshahi, A. 1982.** Effect and interaction of environment and composition variables on stability of thiamin in intermediate moisture model systems. Ph. D. Thesis, Univ. Of Wisconsin-Madison.
- Arabshahi, A. y Lund, D.B. 1985.** Considerations in calculating kinetic parameters from experimental data. *J. Food Proc. Eng.,* 7, 239-251.
- Arcot, J. y Shrestha, A. 2005.** Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 16, 253-266.
- Arenz, S., Ruckerl, R., Koletzko, B., Von Kries, R. 2004.** Breast-feeding and childhood obesity—a systematic review. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004;28 :1247 –1256
- Argiratos, V., Samman, S. 1994.** The effect of calcium carbonate and calcium citrate on the absorption of zinc in healthy female subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48: 198-204.
- Arkbåge, K., Verwei, M., Havenaar, R., Witthöft, C. 2003.** Bioaccessibility of folic acid and (6S)-5-Methyltetrahydrofoalte decreases after the addition of folate.binding protein to yogurt as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J. Nutr.* 133: 3678-3683.
- Babu, S., Lakshmaiah, N. 1987.** Availability of food folate by liver folate repletion in rats. *Nutr. Rep. Int.* 35: 831-836.
- Bachrach, V.R., Schwarz, E., Bachrach, L.R. 2003.** Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 157:237 – 243
- Bagley, P.J. and Selhub, J. 1997.** Analysis of folate using combined affinity and ion- pair chromatographic. *Methods Enzymol.* 281: 16-25.
- Bailey L.B, Gregory 3rd JF. 1999.** Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: Metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 129:919–922.
- Bailey LB, Barton LE, Hillier SE, Cerda JJ. 1988.** Bioavailability of mono and polyglutamyl folate in human subjects. *Nutrition Rep. Int.*; 38; 3: 509-18.
- Bailey LB, Moyers S, Gregory 3rd JF. 2001.** Folate. In Bowman BA, Russell RM (eds): “Present Knowledge in Nutrition,” 8th ed. Washington, DC: ILSI Press, pp 214–229.
- Bailey, L.B. 1995.** Folate in Health and Disease, Marcel Dekker, New York.
- Balaghi, M., Horne, D.W., Wagner, C. 1993.** Hepatic one carbon metabolism in early folate deficiency in rats. *Biochem. J.* 291: 145-149.

- Balagui, M., Horne, D.W., Wagner, C. 1993.** Hepatic one-carbon metabolism in early folate deficiency in rats. *Biochem. J.* 291: 145-149.
- Ball, G.F.M. 1998.** Folate. In: *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. Chapman & Hall. Cornwall. pp. 439-495.
- Ball, G.M.F. 1996.** Determination of the fat-soluble vitamins in foods by high-performance liquid chromatography. In L.M.L. Nolle (Ed.), *Handbook of food analysis* (pp. 601-647). New York: Marcel Dekker Inc.
- Balley, L.B., Barton, L.E., Hillier, S.E., Creda, J.J. 1988.** Bioavailability of mono and polyglutamyl folate in human subjects. *Nutr. Rep. Int.* 38: 509-518.
- Ballot, D.E., MacPhail, A.P., Bothwell, T.H., Gillooly, M., Mayet, F.G. 1989.** Fortification of curry powder with Na Fe (III) EDTA in an iron deficient population: report of a controlled iron fortification trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 162-169.
- Bannerman, R.M. O'Brien, J.R.P., Witts, L.J. 1962.** Iron absorption in experimental iron deficiency. *Blood*, 20: 532.
- Barberá, R., Farré, R. 1992.** Biodisponibilidad de los elementos traza. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.* 32(4): 381-399.
- Barrett, J. F. R., Whittaker, P. G., Fenwick, J. D., Williams, J. G and Lind, T. 1994.** Comparison of stable isotopes and radioisotopes in the measurement of iron absorption in healthy women. *Clin. Sci.* 87: 91-95.
- Basset, G.J.C., Quinlivan, E.P., Gregory, J.F., Hanson, A.D. 2005.** Folate synthesis and mechanism in plants and prospects for biofortification. *Crop. Sci.* 45, 449-453.
- Bässler, K.H., Golly, I., Loew, D., Pietrzik, K. 2002.** In: Urban and Fisher, editors. *Vitamin-Lexikon*. 3rd ed. Munich. 1-178.
- Bates, C.J., Prentice, A. 1994.** Breast milk as a source of vitamins essential minerals and trace elements. *Pharmac. Ther.* 62: 193-220.
- Baugh, C.M. & Krumdieck, C.L. 1971.** Naturally occurring folates. *Annals of the New York Academy of Sciences* 186, 7-28.
- Beard JL. 2001.** Functional consequences of nutritional anemia in adults. En: Ramakrishnan U, editor. *Nutritional anemias*. Boca Raton: CRC Press; p.111-28.
- Beard, J. L. 2000.** Iron requirements in adolescents females. *J. Nutr.* 130: 440S-442S.
- Beillot, J.P. 2003.** In *Les Vitamines dans les Industries Agroalimentaires*. Ed. Tec, Doc Lavoisier. 289-332.
- Belcher, E.H., Harriss, E.B. 1959.** Studies of red cell life span in the rat. *J. Physiol.* 146: 217-234.
- Belitz, H.D., Grosch, W. 1999.** *Vitamins in Food Chemistry*, 2nd edn. Pp. 383-387.
- Bener, A., Denic, S., Galadari, S. 2001.** Longer breast-feeding and protection against childhood leukaemia and lymphomas. *Eur J Cancer.* 37 :234-238
- Bessman, J.D., Gilmer, P.R., Gardner, F.H. 1983.** Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am. J. Clin. Pathol.* 80: 322-329.
- Bhandari, N., Bahl, R., Mazumdar, S., Martinez, J., Black, R.E., Bhan, M.K. 2003.** Effect of community-based promotion of exclusive breastfeeding on diarrhoeal illness and growth: a cluster randomized controlled trial. *Infant Feeding Study Group. Lancet.* 361: 1418-1423.
- Bhandari, S.D, Gregory; J.F. 1990.** Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal Pteroylpolyglutamate hydrolase activity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 114, 1770-1776.
- Bhandari, S.D., Gregory, J.F., 1992.** Folic acid, 5-methyl- tetrahydrofolate and 5- formyl-tetrahydrofolate exhibit equivalent intestinal absorption, metabolism and in vivo kinetics in rats. *Journal and Nutrition*, 12, 1847-1854.
- Bilic, N., Sieber, R. 1988.** HPLC determination of retinol and alpha-tocopherol in raw, pasteurised and cooked milk. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung.* 17(1): 17.

- Birlouez-Aragon, I., Pischetsrieder, M., Leclère, J., Morales, J. F., Hasenkopf, K., Kientsch-Engel, R., Ducauze, C.J., Rutledge, D. 2004.** Assessment of protein glycation markers in infant formulas. *Food Chem.* 87: 253-259.
- Birn, H., Selhub, J., Christensen, E.I., 1993.** Internalisation and intracellular transport of folate-binding in rat kidney proximal tubule. *Am J Physiol* 264: 302- 310.
- Bjorklund, N.K. & Gordon, R. 2006.** A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. *International Journal of Developmental Biology* 50, 135-141.
- Blakley, R.L. 1988.** IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature (JCBN) Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds recommendations 1986. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 605-607.
- Blaymore Bier, J., Oliver, T., Ferguson, A., Vohr, B.R. 2002.** Human milk reduces outpatient upper respiratory symptoms in premature infants during their first year of life. *J. Perinatol.* 22: 354-359.
- Boccio, J., Salgueiro, J., Lysionek, A., Zubillaga, M., Goldman, C., Weill, R., Caro, R. 2003.** Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. *Arch. Latinoam. Nutr.* 53 (2): 119-132.
- Bolin, H.R. 1982.** Effect of processing of nutrient composition of food: fruits and fruit products. In: Rechcigl, Jr., M (ed.), *Handbook of Nutritive Value of Processed Food. Food for Human Use*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 310.
- Booth, J.W., Aukett, M.A. 1997.** Iron deficiency anaemia in infancy and early childhood. *Arch. Dis. Child.* 76: 549-553
- Borschel, M.W. 1995.** Vitamin B6 in infancy: requirements and current feeding practices. IN: Ratten D.J, editor. *Vitamin B6 metabolism in pregnancy, lactation and infancy.* Boca Raton, Fla.: CRC Press. P 109-124.
- Bothwell, T. H., Bradlow, B. A., Jacobs, P y col. 1964.** Iron metabolism in scurvy with special reference to erythropoiesis. *Br. J. Haematol.* 10: 50-58.
- Bothwell, T. H., Pirzio-Biroli, G., Finch, C.A. 1958.** Iron absorption. I. Factors influencing absorption. *J. Lab. Clin. Med.* 51: 24-36.
- Bothwell, T.H. 1999.** Iron fortification in special reference to the role of iron EDTA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrition*, 49 (Suppl.2): 23S-33S.
- Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D., Finch, C.A. 1979.** *Iron Metabolism in Man*, pp. 7-81. Blackwell Scientific Publications., Oxford.
- Bothwell, T.H., MacPhail, A.P. 2004.** The potencial role of NaFeEDTA as an iron fortificant. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74: 421-434.
- Botto, L.D., Moore, C.A., Khoury, M.J., Erickson, J.D. 1999.** Neural tube defects. *N. Engl. J. Med.* 341, 1509-1519.
- Bourdonnais, A. 1994.** Stabilité d'une solution de Vitamine A au cours du temps en présence de Métalosate de fer. *Zootech. Tech. Bull.*
- Boushy C. J., Beresford SAA., Omenn G.S., Motulsky A. G. 1995.** A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA*; 274, 13:1049-57.
- Bouwer, C., Stanley, F.J., Croft, M., de Klerk, N., Davis, R.E and Nicol, D.J. 1993.** Absorption of pteroylpolylglutamates in mothers of infants with neural- tube defects. *British Journal of Nutrition*, 69, 827-834.
- Bovell-Benjamin, A.C., Allen, L., Frankel, E., Guinard, J. 1999.** Sensory quality and lipid oxidation of maize porridge as affected by iron amino chelates and EDTA. *J. Food Sci.* 64: 371-376.
- Bovell-Benjamin, A.C., Viteri, F.E., Allen, L.H. 2000.** Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. *Am. J. Clin. Nytr.* 71: 1563-1569.
- Brattström L., Landgren F., Israelsson B. et al. 1998.** Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta- analysis of randomised trials. *Br. Med. J.*;316894-8.

- Brise, H., Hallberg, L. 1962a.** A method for comparative studies on iron absorption in man using two radioiron isotopes. *Acta Med. Scand. Suppl.* 59: 7-22.
- British Nutrition Foundation. 1996.** Iron. Nutritional and physiological significance. Chapman y Hall (Eds.), London, UK.
- Brody, T. 1999.** Nutritional biochemistry, Second ed. San Diego [etc.]: Academic Press.
- Brouwer I.A., van Dusseldorp M., Thomas CMG. 1999.** Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.*;69:99-104.
- Brouwer I.A., van Dusseldorp M., West C.E., Meyboom S., Thomas C.M., Duran M., van-het-Hof K.H., Eskes T.K., Hautvast J.G., Steegers-Theunissen R.P. 1999.** Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J. Nutr.*; 129: 1135-9.
- Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L. 1989.** Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43: 547-558.
- Buchowski, M.S., Mahoney, A.W., Kalpalathika, P.V. 1989.** Nonheme iron absorption, apparent iron absorption and hemoglobin regeneration efficiency in anemic and normal rats fed with dietary heme and nonheme iron at various levels. *Nutrition Research.* 9, 773-783.
- Bueno, M. y Pérez, V. 1986.** Alimentación durante los dos primeros años de vida. En: Manual de pediatría práctica. Eds. Pombo, M. y Díaz de Santos S.A. Madrid, España.
- Busby, A., Armstrong, B., Dolk, H., Armstrong, N., Haeusler, M., Berghold, A., Gillerot, Y., Baguette, A., y col. 2005.** Preventing neural tube defects in Europe: A missed opportunity. *Reproductive Toxicology* 20, 393-402.
- Casado de Frías, E., Maluenda, C. y Casado, E. 1993.** Alimentación del niño. En: Nutrición y dietética, aspectos sanitarios. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, España. Pp: 383-403.
- Cazzola, M., Huebers, H., Sayers, M., MacPhail, A., Eng, M., Finch, C. 1985.** Transferrin saturation, plasma iron turnover, and transferrin uptake in normal humans. *Blood.* 66: 935-939.
- Cervera, P., Clapes, J. Y Rigolfas, R. 1993.** Alimentación del lactante y de la primera infancia. En: Alimentación y dietoterapia. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. Madrid, España. Pp: 135-138.
- Chanarin, I., Rothman, D., Berry, V. 1965.** Iron deficiency and its relation to folic acid status in pregnancy: results of a clinical trial. *BMJ.* 5433: 480-485.
- Charlton R.W., Jacobs, P., Torrance, J.D., Bothwell, T.H. 1965.** The role of the intestinal mucosa in iron absorption. *J. Clin. Invest.* 44: 543-554.
- Choe, E., Huang, R., Min, D.B. 2005.** Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *J. Food Sci.* 70 (1): R28-R36.
- Choi, S.W., Mason, J.B. 2000.** Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J. Nutr.* 130, 129-132.
- Chow, C. K. 1979.** Nutritional influence on cellular antioxidant defence systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 1066.
- Chulada, P.C., Arbes, S.J Jr., Dunson, D., Zeldin, D.C. 2003.** Breast-feeding and the prevalence of asthma and wheeze in children: analyses from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *J Allergy Clin Immunol.* 111 :328 –336.
- Clagett-Dame, M., De Luca, H.F. 2002.** The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 347-381.
- Clark, N. G., Sheard, N. F., Kelleher, J. F. 1992.** Treatment of iron deficiency anemia complicated by scurvy and folic acid deficiency. *Nutr. Rev.* 50: 134-137.
- Clifford, A.J., Jones, A.D., Bills, N.D. 1990.** Bioavailability of folates in selected foods

incorporated into amino acid based diets fed to rats. *J. Nutr.* 120: 1640-1647.

- Cochi, S.L., Fleming, D.W., Hightower, A.W. y col. 1986.** Primary invasive Haemophilus influenzae type b disease: a population-based assessment of risk factors. *J. Pediatr.* 108: 887-896.
- Codex Alimentarius Commission. 1994.** Joint FAO/WHO Food Standard Programme. Codex alimentarius vol. 4. Foods for special dietary uses (including foods for infants and children). Part 2 – Foods for infants and children. Rome: Food and Agriculture Organization and World Health Organization. P. 15-75.
- Cohen, E. y Saguy, I. (1985).** Statistical evaluation of Arrhenius model and its applicability in prediction of food quality losses. *J. Food Proc. Preserv.* 9, 273-290.
- Combs, G. F. Jr. 1992.** The Vitamins. Fundamental aspects in Nutritional Health. Academic Press, San Diego, CA.
- Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy. 2000.** Folic acid and the prevention of disease. London: HMSO.
- Conrad, M. E., Weintraub, L. R., Crosby, W. H. 1964.** The role of the intestine in iron kinetics. *J. Clin. Invest.* 43: 963-974.
- Conrad, M.E., Crosby, W.H. 1963.** Intestinal mucosa mechanisms controlling iron absorption. *Blood.* 22: 406-415.
- Conrad, M.E., Parmley, R.T., Osterloh, K., 1987.** Small intestinal regulation of iron absorption in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 110, 418-426.
- Conrad, M.E., Umbreit, J.N. Moore, E.G., 1999.** Iron absorption and transport. *Am. J. Med. Sci.* 318, 213-229.
- Cook, J. D., Finch, C.A. 1979.** Assessing iron status of a population. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2115-2119.
- Cook, J. D., Monsen, E. R. 1977.** Vitamin C, the common cold, and iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 235-241.
- Cook, J. D., Reusser, M. E. 1983.** Iron fortification: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 38, 648-659.
- Cook, J.D., Boy, E., Flowers, C., Daroca, M del C. 2005.** The influence of high altitude living on body iron. *Blood.* 106: 1441-1446.
- Cook, J.D., Dassenko, S.A., Whittaker, P. 1991.** Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 106-111.
- Cook, R. 2001.** Folate metabolism, in: R. Carmel, D.W. Jacobsen (Eds.), *Homocysteine in Health and Disease*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 113-134.
- Cornelissen, M., von Kries, R., Loughnan, P., Schubiger, G. 1997.** Prevention of vitamin K deficiency bleeding: efficacy of different multiple oral dose schedules of vitamin K. *Eur. J. Pediatr.* 156: 126-130.
- Cort, W.M., Merguens, W., Greene, A. 1978.** Stability of alpha and gamma-tocopherol: Fe⁺³ and Cu⁺² interactions. *J. Food Sci.* 43: 797-798.
- Desai, I.D., Machlin, L. J. 1985. Vitamin E. In J. Augustin, B.P. Klein, S. Becker, & P.B. Venugopal (Eds.), *Methods of vitamin assay* (4th ed.) pp. 255-281.
- Crichton, R. 2001.** *Inorganic Biochemistry of iron Metabolism: From Molecular Mechanism to Clinical Consequences.* 2e. 191-206.
- Csaszar, A., Abel, T. 2001.** Receptor polymorphisms and diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 414: 9-22.
- Czeizel, A.E., Dudas, I. 1992.** Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*; 327:1832-1835.
- Dallman, P.R., Yip, R. 1989.** Changing characteristics of childhood anemia. *J. Pediatr.* 114: 161-164.
- Daly, A., MacDonald, A., Aukett, A., Williams, J., Wolf, A., Davidson, J., Booth, I.W. 1996.** Prevention of anaemia in inner city toddlers by an iron supplemented cow's milk formula. *Arch. Dis. Child.* 75: 9-16.

- Darnton-Hill, I. 1998.** Overview: rationale and elements of a successful food-fortification programme. *Food and Nutrition Bulletin* 19, 92-100.
- Darnton-Hill, I., Nalubola, R. 2002.** Fortification strategies to meet micronutrient needs: successes and failures. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 231-241.
- Davídek, J., Velíšek, J., Pokorný, J. 1990.** Chemical Change During Food Processing, Elsevier, Amsterdam (p. 284).
- Dawson, M.J. 2000.** The importance of vitamin A in nutrition. *Curr. Pharm. Des.* 6: 311-325.
- Day, B.P.F., Gregory III, J.F. 1983.** Thermal stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in liquid model food systems. *Journal of Food Science.* 48: 581
- De Paz, R., y col. 2006.** Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico, *Nutr. Hosp.;* 21 (1): 113-9.
- De Paz, R., Hernández-Navarro, F. 2005.** Management, prevention and control of pernicious anemia. *Nutr. Hosp.* 20 (6): 433-435-
- Deehr, M.S., Dallal, G.E., Smith, K.T., Taulbee, J.D., Dawson-Hughes, B. 1990.** Effects of different calcium sources on iron absorption in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 95-99.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas.** Directiva de la comisión 91/321/CEE, de 14 Mayo de 1991, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación. *Diario Oficial n° L175 de 04/07/1991;* p. 0035-0049.
- Díaz, M., Rosado, J.L., Allen, L.H., Abrams, S., garcia, O.P. 2003.** The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 436-440.
- DIRECTIVA 2006/37/CE DE LA COMISIÓN** de 30 de marzo de 2006 por la que se modifica el anexo II de la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en cuanto a la inclusión de determinadas sustancias.
- Donovan, A., Brownile, A., Zhou, Y. y col. 2000.** Positional cloning of zebrafish ferroportin identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403, 776-781.
- Dostalova, L., Salmenpera, L., Vaclavikova, V., Heinz-Erian, P., Schuep, W. 1988.** Vitamin concentrations in term milk of European mothers. In: Berger H, Editor. *Vitamins and Minerals in Pregnancy and Lactation.* Nestle Nutrition Workshop Series. Vol 16, New York: Raven Press. P 275-298.
- Dwyer, J. T., Garcea, A. O., Evans, M., Li, D., Lytle, L., Hoelscher, D., Nicklas, T. A., Zive, M. 2001.** Do adolescent vitamin-mineral supplement users have better nutrient intakes than nonusers? Observations from the CATCH tracking study. *Journal of the American Dietetic Association* 101, 1340-1346.
- EFSA. 2004.** Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food on a request from the Commission related to Calcium L-Methylfolate. Question N° EFSA-Q-2004-007, 135, 1-20.
- EFSA. 2006.** Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and materials in Contact with Food on a request from the commission related to Ferrous Bisglycinate as a source of iron for use in the manufacturing of foods and in food supplements. *The EFSA Journal.* 299: 1-17.
- Eitenmiller, R.R. & Landen, W.O.J. 1999.** Folate. In: *Vitamin analysis for health and food sciences.* Eds. R.R. Eitenmiller & W.O.J. Landen). CRC Press. New York. pp. 411-466.
- Eitenmiller, R.R., Landen, W.O.J. 1999.** Vitamin A and β -carotene. Ascorbic acid. Thiamin. Vitamin B6. Folate. In: Eitenmiller, R.R., Landen, W.O (Eds.), *Vitamin Analysis for the Health and Food Science.* CRC Press, Boca Raton, FL (pp. 15-19, 226-228, 275, 375, 411-465).
- ESPGHAN. Committee on Nutrition. 1990.** Comment on the composition of cow's milk based

- follow-up formulas. *Acta Paediatr. Scand.* 79: 250-254.
- ESPGHAN. Committee on Nutrition. 1991.** Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. *Acta Paediatr. Scand.* 80: 887-896.
- ESPGHAN. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2002.** Committee on Nutrition: Aggett, P.J., Agostini, C., Axelsson, I., Bresson, J.L., Goulet, O., Hernell, O., Kolezko, B., Lafeber, H.L., Michaelsen, K.F., Micheli, J.L., Rigo, J., Szajewska, H., Weaver, L.T. Iron metabolism and needs in early childhood: do we know enough?. *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.* 34: 337-345.
- Esteve, M.J. 1995.** Comparison of voltametric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chemistry.* 52: 99-102.
- EUROPEAN COMMISSION HEALTH and CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. 2003.**
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index>
- Faber, M., Kvalsvig, J.D., Lombard, C.J., Bernade, A.J. 2005.** Effect of a fortified maize-meal porridge on anemia, micronutrients status, and motor development of infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 1032-1039.
- Fairbanks, V.F., Beutler, E. 1995.** Iron metabolism. In: Beutler, E, Lichtman, M.A, Coller, B.S., Kipps, T.J, eds. *Williams Hematology.* 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 369-380.
- Fairbanks, V.F., Klee, G.G. 1994.** Biochemical aspects of haematology. In: Burtis CA, Ashwood, ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry,* 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders: 1974-2072.
- Fairweather-Tait, S. J. 1987.** The concept of bioavailability as it relates to iron nutrition. *Nutr. Res.* 7: 319-325.
- Fairweather-Tait, S. J. 1992.** Bioavailability of trace elements. *Food Chem.* 43: 213-217.
- Fairweather-Tait, S. J., Piper, Z., Fatemi, S. J., Moore, G. R. 1991.** The effect of tea on iron and aluminium metabolism in the rat. *Br. J. Nutr.* 65: 61-68.
- Fairweather-Tait, S.J. 1996.** Iron deficiency anaemia: epidemiology, complications, diagnosis and management. *Int. Sem. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.* 5: 3-7
- FAO. 1996.** Food Fortification: Technology and Quality Control. Report of an FAO Technical Meeting, Rome, 20-23 November 1995. FAO Food and Nutrition Paper. Rome: FAO.
- FAO/OMS. 1989.** Comisión del Codex Alimentarius. Normas del Codex para alimentos para regímenes especiales incluidos alimentos para lactantes y niños, y relativo al código de prácticas de higiene. Reunión FAO/OMS; CAC (Suppl.4) Roma, 4.
- FAO/OMS. 2002,** Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/OMS expert consultation, Bangkok, Thailand. Ed. WORLD HEALTH ORGANIZATION, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; Rome.
- FAO/WHO. 1988.** Requiriments of vitamin A, iron, folate and vitamna B12. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome: FAO. (FAO Food and Nutririon Series N° 23).
- FAO/WHO. 1998/revision 2004.** Requiriments of vitamin A, iron, folate and vitamin B12. FAO and Nutrition series, No 23. Rome: FAO.p. 33-50 (revision 2004: p. 246-278).
- Fava, M., Borus, J.S., Alpert, J.E., Nierenberg, A.A., Rosenbaum, J.F., Bottiglieri, T. 1997.** Folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorders. *Am. J. Psychiatry,* 154, 426-428.
- Feldman, R., Eidelman, A.I. 2003.** Direct and indirect effects of breast-milk on the neurobehavioral and cognitive development of premature infants. *Dev Psychobiol.* 43 :109 –119
- Ferrer, M. (1986).** Determinación de la vida comercial de un alimento deshidratado, *Alimentaria,* enero-febrero, 43-48.

- Ferrer-Lorente, B., Dalmau-Serra, J. 2005.** Fórmulas de continuación y fórmulas de crecimiento. *Acta Paediatr. Esp.* 63: 471-475.
- Fidler, M.C., Davidsson, L., Zeder, C., Walczyk, T., Hurrell, R.F. 2003.** Iron absorption from ferrous fumarate in adult women is influenced by ascorbic acid but not by Na₂EDTA. *British Journal of Nutrition.* 90: 1081-1085.
- Fidler, M.C., Walczyk, T., Davidsson, L., y col. 2004.** A micronised, dispersible ferric pyrophosphate with high relative bioavailability in man. *Br. J. Nutr.* 91: 107-112.
- Finch, C. 1994.** Regulators of iron balance in humans. *Blood.* 84: 1697-1702.
- Finch, C. A., Huebers, H. 1982.** Perspectives in iron metabolism. *New England Journal of Medicine.* 306: 1520-1528.
- Finglas, P.M., Morgan, M.R.A. 1992.** (Título). *Food Chem.* 49: 191.
- Fisberg, M., Braga, J.A.P., Kliamca, P.E., Ferreira, A.M.A., Berezowski, M. 1995.** Use of "Pettit Suisse" cheese enriched with iron in the prevention of anemia among preschool children. *Clin. Ped.* 19: 14-24.
- Fischer, J. G., Glauert, H. P., Yin, T., Sweeney-Reeves, M. L., Larmonier, N., Black, M. C. 2002.** Moderate iron overload enhances lipid peroxidation in livers of rats, but does not affect NF-KappaB activation induced by the peroxisome proliferator. *J. Nutr.* 132: 2525-2531.
- Fishman, S. M., Christian, P., West, K. P. 2000.** The role of vitamins in the prevention and control of anemia. *Public Health Nutrition:* 3(2), 125-150.
- Flanagan, P.R. 1989.** Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatric. Scand.* 361: 21S-30S.
- Fleming, A. F. 1981.** Haematological manifestations of malaria and other parasitic diseases. *Clinics in Haematology* 10, 983-1011.
- Fleming, M.D., Trenor, C.C., Su, M.A., Foerzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., Andrews, N.C., 1997.** Microcytic anemia mice have a mutation in Nramp2 a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* 16, 383-386.
- FNB. Food and Nutrition Board. 1989.** National Research Council (US) & Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs. Recommended Dietary Allowances 1989. Washington, D.C.: Institute of Medicine. National Academy Press.
- FNB. Food and Nutrition Board. 2002.** Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, D.C.: Institute of Medicine. National Academy Press,
- Fomon, S.J. 2001.** Infant feeding in the 20th century: formula and breast milk. *J. Nutr. Suppl.* 131: S409-420.
- Forbes, A. L., Arnaud, M. J., Chichester, C. O., Cook, J. D., Harrinson, B. N., Hurrell, R. F., Kahn, S. G., Morris, E. R., Tanner, J. T., Whittaker, P y col. 1989.** Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 225-238.
- Forssén, K.M., Jägerstad, M.I., Wigetz, K., Witthöft, C.M. 2000.** Foliates and dairy products: a critical update. *J. Am. Coll. Nutr.* 19: 100S-110S.
- Fox, H.M. 1991.** Pantothenic acid. IN: Machlin, L.J. (Ed.), *Handbook of Vitamins*, second ed. Marcel Dekker, New York (Chapter 11).
- Fox, T.E., Eagles, J., Fairweather-Tait, S.J. 1998.** Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant food. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 664-668.
- Freeman, V.E., Mulder, J., vant Hof, M., hoey, H.M.V., Gibney, M.J. 1998.** A longitudinal study of iron status in children at 12, 24 and 36 months. *Public Health Nutr.* 1: 93-100.
- Frías, J., Vidal-Valverde, C. 2000.** Influence of time and A_w during storage on the vitamin content of enteral feeding formula. *Czech Journal of Food Science,* 18: 210-211.
- Frosst P, Blom R, Milos P, Goyette C, Sheppard RG, Matthews GJH, Boers M, den Heijer LAJ, Kluijtmans LP, van den Heuvel, Rozen R. 1995.** A

- candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR. *Nature Genetics* 10, 111-113.
- Galdi, M., Carbone, N., Valencia, M.E. 1989.** Comparison of ferric glycinate to ferrous sulphate in model infant formulas: kinetics of vitamin losses. *J. Food Sci.* 54 (6): 1530-1539.
- Ganz, T. 2003.** Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 102: 783-788.
- Ganz, T. 2005.** Hcpidin – a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling bt macrophages. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 18: 171-182.
- García-Casal, M.N., Layrisse, N. 2001.** The effect of change in pH on the stability of iron bis-glycinate chelate and other iron compounds. *Arch. Latinoam. Nutr.* 51: 35-36.
- Gauch, R., Leuenberger, U. and Müller, U. 1993.** Die Bestimmung von Folsäure (Pteroyl- L- gluteminsäure) in Lebensmitteln mit HPLC. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 84: 295-302)
- Giorgini, E., Fisberg, M., de Paula, R.A., Ferreira, A.M., Valle, J., Braga, J.A. 2001.** The use of sweet rolls fortified wiyh iron bis-glycinate chelate in the prevention of iron deficiency anemia in preschool children. *Arch. Latinoam. Nutr.* 51: 48-53.
- Givas, J.K. & Gutcho, S. 1975.** pH dependence of the binding of folates to milk binder in radioassay of folates. *Clinical Chemistry* 21, 427-428.
- Goldman, A., Smith, C.W. 1973.** Host resistance factors in Human milk. *J. Pediatr.* 82: 1082-1090.
- Görner, F., Uherová, R. 1980.** Vitamin changes in ultra high-temperature sterilised milk during storage. *Nahrung.* 24 (4/5): 373-379.
- Green, R., Miller, J.W. 2005.** Vitamin B12 deficiency is the dominant nutricional cause of hiperhomocisteinemia in a folic acid- fortified population. *Clin. Chem. Lab Med;* 43: 1048-51.
- Green, J.C., Nichols, B.P., Matthews, R.G. 1996.** Folate biosynthesis, reduction, and polyglutamylaton, in: F.C Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, vol. I, ASM Press , Washington, DC, pp. 665-673.
- Green, R., Miller, J.W. 1999.** Folate deficiency beyond megaloblastic anemia : hyperhomocysteinemia and other manifestation of dysfunctional folate status. *Semin. Hematol.* 36, 47-64.
- Gregory III, J.F. 1985.** Chemical changes of vitamins during food processing. In: Richardson, T., Finley, J.W. (Eds.), *Chemical Changes in Food During Processing.* AVI Publishing Company, Westport, CN (Chapter 17).
- Gregory III, J.F. 1994.** Chemical and nutritional aspects of folate research; analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. IN: Kinsella, J.E. (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 33. Academic Press, New York, p.101.
- Gregory J.F., Sartain D.B., Day B.P.F. 1984.** Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. *J Nutr.* 114: 341–353.
- Gregory, J.F. 1988.** Recent developments in methods for the assessment of vitamin bioavailability. *Food Technology.* 42: 230-238.
- Gregory, J. F. 1989.** Chemical and Nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folate. *Adv. Food Nutrition Res.* 33: 1-101.
- Gregory, J. F. 1996.** Vitamins. In: *Food Chemistry*, 3rd ed. Fennema, O.R. (ed), p. 531-616. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gregory, J.F. 1995.** The bioavailability of folate. In: *Folate in Health and Disease.* Bailey, L.B. (Ed), p. 195-235. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gregory, J.F., Day, B.P.F. & Ristow, K.A. 1982.** Comparison of high performance liquid chromatographic, radiometric and *lactobacillus casei* methods for the determination of folacin in selected foods. *Journal of Food Science* 47, 1568-1571.
- Gregory, J.F., Engelhardt, R., Bhandari, S.D., Sartain, D.B y Gustafson, S.K. 1990.** Adequacy of extraction techniques for determination of folate

- in foods and other biological materials. *J. Food Comp. Anal.* 3: 134-144.
- Groehn, V. & Moser, R. 1999.** Synthesis of optically pure diastereoisomers of reduced folates. *Pteridines* 10, 95-100.
- Grummer-Strawn, L.M., Mei, Z. 2004.** Does breastfeeding protect against pediatric overweight? Analysis of longitudinal data from the Centers for Disease Control and Prevention Pediatric Nutrition Surveillance System. *Pediatrics.* 113(2).
- Gualandro, S., Name, J.J. 1996.** Anemia and iron deficiency in a population in Brazil. The effect of the consumption of food containing ferrous amino acid chelate or ferrous sulphate. The 26th Congress of the International Congress of Hematology Singapore.
- Guiguem, H., Birlouez-Aragon, I. 2005.** Effects of sterilization, packaging, and storage on vitamin C degradation, protein denaturation, and glycation in fortified milks. *J. Dairy Sci.* 88: 891-899.
- Gunshin, H., MacKenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.I., Hedinger, M.A., 1997.** Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488.
- Haas JD, Brownlie T IV. 2001.** Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J Nutr*; 131:676S-90S.
- Hallberg, L. 1996.** Iron requirements, iron balance and iron deficiency in menstruating and pregnant women. In: *Iron Nutrition in Health and Disease* (Hallberg, L. & Asp, N.-G., eds.) John Libbey & Co., pp 165-182.
- Hallberg, L. 2002.** Advantages and disadvantages of an iron-rich diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, Suppl 1: S12-S18.
- Hallberg, L., Brune, M., Erlandsson, M., Sandberg, A. S. Rossander-Hulten, L. 1991a.** Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 112-119.
- Hallberg, L., Brune, M., Rossander-Hunthen, L. 1987.** Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption?. *Ann. NY Acad. Sci.* 498: 324-332.
- Hallberg, L., Hulthén, L., Gramatkovski, E. 1997.** Iron absorption from the whole diet in men: how effective is the regulation of iron absorption?. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 347-356.
- Hallberg, L., Rossander-Hulten, L., Brune, M., Glerup, A. 1992.** Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46: 317-327.
- Halsted, C.H., 1995.** Alcohol and folate interactions: Clinical implications. IN: *Folate in Health and Disease*, pp. 313-327. (LB Bailey, editor). New York: Marcel Dekker.
- Halsted, CH, 1990.** Intestinal absorption of dietary folates. In: *Folic Acid Metabolism in Health and Disease* (Picciano, MF, Stokstad, ELR, and Gregory, JF, eds.), pp. 23-45, Wiley-Liss, New York.
- Hambraeus, L., Forsum, E., Lönnerdal, B. 1975.** Nutritional aspects of breast milk and cow's milk formulas. In: *Hambraeus, L., Hanson, L., MacFarlane, H. eds. Symposium on Food and Immunology.* Stockholm, Sweden: Almqvist and Wiksell.
- Hannon-Fletcher, M.P., Armstrong, N.C., Scott, J.M., Pentieva, K., Bradbury, I., Ward, M., Strain, J.J., Dunn, A.A., Molloy, A.M., Scullion, M.A. and McNulty, H., 2004.** Determination of the bioavailability of food folate in a controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition.* 80:911-918.
- Hansen, C.M., Leklem, J.E., Miller, L.T. 1996.** Vitamin B6 status of women with a constant intake of vitamin B6 changes with three levels of dietary protein. *J. Nutr.* 126: 1891-1901.
- Hanson, A.D., Gregory, J.F. 2002.** Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 244-249.
- Haralampu, S.G., Saguy, I. y Karel, M. (1985).** Estimation of Arrhenius parameters three least

- squares methods. *J. Food Proc. Preserv.* 9, 129-143.
- Harkins, L.S., Sirel, J.M., McKay, P.J., Wylie, R.C., Titterington, D.M., Rowan, R.M. 1994.** Discriminant analysis of macrocytic red cells. *Clin. Lab. Haematol.* 16: 225-234.
- Harris, R.S. 1987.** General discussion on the stability of nutrients. In: Karmas, E., Harris, R.S (eds.), *Nutritional Evaluation of Food Processing.* Van Nostrand Reinhold, New York, p. 4.
- Harris, Z.L., Klomp, L.W., gitlin, J.D., 1998.** Aceruloplasminemia: a inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am.J. Clin. Nutr.* 67, 972-977.
- Haschke, F. 1999.** The rationale for iron-fortified follow-on formulas and growing-up milks. *Acta Paediatr.* 88: 1312-1313.
- Haschke, F. 2000.** Iron requirements during infancy and early childhood. In: Niels CR Råihä and Firmino F Rubaltelli, eds. *Nestle Nutrition Workshop Series, Pediatric Program.* Philadelphia: Ed. Nestec Ltd., Vevey/Lippincott Williams&Wikins. Supl. 47: 53-69.
- Haschke, F., Male, C. 1996.** Iron nutritional status during early childhood. In: Hallberg L, Asp N-G, editors. *Iron nutrition in health and disease.* London: John Libbey. p. 325-329.
- Hasenau, Susan M. et al 2002.** MCN, American Journal of Maternal Chile Nursing. 27(2): 87-91.
- Hawkes, J.G., Villota, R. 1989.** Foliates in food: reactivity, stability during processing and nutritional implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 28(6): 439-538.
- Heinig, M.J. 2001.** Host defense benefits of breastfeeding for the infant. Effect of breastfeeding duration and exclusivity. *Pediatr. Clin. North Am.* 48: 105-123.
- Hemmilä, I., Dakubu, S., Mukkala, V.M., Siitari, H., Lövgren, T. 1984.** Europium as a label in time-resolved immunofluorometri assays. *Anal. Biochem.* 137: 335-343.
- Henderson, G.B. 1990.** Folate binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 319-335.
- Herbert, V. 1984.** Vitamin B₁₂. In: Olsen, R. E., Broquist, H. P., Chichester, C. O., y col., eds *Nutrition Reviews'Present Knowledge in Nutrition,* 5th edn. Washington, DC: The Nutrition Foundation; 347-364.
- Herbert, V. and Das, K. C. 1994.** Folic acid and Vitamin B12. In *Modern Nutrition in Health and Disease.* Vol. 1. Iea and Febiger, Philadelphia, 402-425.
- Herbig, A.K., Stover, P.J. 2002.** Regulation of folate metabolism by iron. In: Massaro EJ, Rogers JM, editors. *Folate and human development.* New Jersey: Humana Press; 241-262.
- Hercberg, S., Preziosi, P., Galan, P. 2001.** Iron deficiency in Europe. *Public Health Nutrition.* 4(2B): 537.-545.
- Hernández Rodriguez, M. 1999.** Capítulo 52. Alimentación en la primera infancia. En: *Tratado de Nutrición.* Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. Pp, 809-829.
- Hernell, O., Bläckberg, L. 1994.** Molecular aspects of fat digestion in the newborn. *Acta Paediatr.* 405(S1): 65-69.
- Hernell, O., Lönerdal, B. 2004.** Is iron deficiency in infants and young children common in Scandinavian and is there a need for enforced primary prevention?. *Acta Paediatr.* 93: 1024-1026.
- Hernell, O., Lönnerdal, B. 2002.** Iron status of infants fed low iron formula: no effect of added bovine lactoferrin or nucleotides. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 858-864.
- Herreid, E.O., Ruskin, B. 1952.** Ascorbic acid and riboflavin loss and flavour development in milk exposed to the sun in amber, clear, paper and ruby bottles. *J.Dairy Sci.* 35: 772-778.
- Hertrampf, E. 2002.** Iron fortification in the Americas. *Nutr. Rev.* 60: S22-S25.
- Hertrampf, E., Olivares, M. 2004.** Iron amino acid chelates. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74: 435-443.
- Heudi, O., Kiliñç, T., Fontannaz, P. 2005.** Separation of water soluble vitamins by reverse-phase high performance liquid chromatography

- with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *J. Chroma.* 1070: 49-56.
- Holt, D.L., Wehling, R.L. and Zeece, M.G. 1988.** Determination of native folate in milk and other dairy products by high-performance liquid chromatographic. *J. Chrom.* 449: 271-279.
- Homocysteine lowering trialists collaboration, 1998.** Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ*, 316: 894-8.
- Hong, K.H., Keen, C.L., Mizuno, Y., Johnston, K.E., Tamura, T. 2000.** Effects of dietary zinc deficiency on homocysteine and folate metabolism in rats. *The journal of nutritional biochemistry*, vol. 11, issue 3, 165-169.
- Hoppner, K., Lampi, B. 1985.** Liver folacin as a response parameter for a folacin bioassay in rats. *Nutr. Rep. Int.* 31: 203-211.
- Horne, R.S., Parslow, P.M., Ferens, D., Watts, A.M., Adamson, T.M. 2004.** Comparison of evoked arousability in breast and formula fed infants. *Arch Dis Child.* 89 (1):22 –25
- House, J.D., O'Connor, C.P., Guenter, W. 2003.** Plasma homocysteine and glycine are sensitive indices of folate status in a rodent model of folate depletion and repletion. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4461-5567.
- Houston, D.K., Johnson M.J., Nozza, R.J., Gunter, E.W., Shea, K.J., Cutler, G.M., Edmonds, J.T. 1999.** Age-related hearing loss, vitamin B-12 and folate in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 564-571.
- Huang, R.S., Hsu, Y.C., Lin, H.L., Yang, F.L. 2001.** Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J. Nutr.* 131: 33-38.
- Huebers, H., Finch, C. 1984.** Transferrin: Physiologic behaviour and clinical implications. *Blood.* 64: 763-767.
- Huebers, H.A., Eng, M.J., Josephson, B.M., Ekpoom, N., Rettmer, R.L., Labbé, R.F y col. 1987.** Plasma iron and transferrin iron-binding capacity evaluated by colorimetric and immunoprecipitation method. *Clin. Chem.* 33: 273-277.
- Huffman, S.L., Baker, J., Shuman, J., Zehmer, E.R. 1998.** The case for promoting multiple vitamin/mineral supplements for women of reproductive age in developing countries. Washington, DC: Linkages Project, Academy for Educational Development
- Huo, J., Sun, J., Miao, H., y col. 2002.** Therapeutic effects of NaFeEDTA fortified soy sauce in anaemic children in China. *Asia Pac. J. CLin. Nutr.* 11: 123-127.
- Hurrell, R. F. 1997a.** Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutrition Reviews*, 55, 210-222.
- Hurrell, R. F., Bothwell, T., Cook, J. D., Dary, O., Davidsson, L., Fairweather-Tait, S., Hallberg, L., Lynch, S., Rosado, J., Walter, T., Whittaker, P. 2002.** The usefulness of elemental iron for cereal flour fortification: A Sustain Task Force Report. *Nutrition Reviews*, 60, 391-406.
- Hurrell, R. F., Furniss, D. E., Burri, J., Whittaker, P., Lynch, S. R., Cook, J. D. 1989.** Iron fortification of infant cereals: a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrous succinate. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 1274-1282.
- Hurrell, R.F., Bothwell, T., Cook, J.D., y col. 2002.** SUSTAIN Task Force. The usefulness of elemental iron for cereal flour fortification: a SUSTAIN Task Force report. *Nutr. Rev.* 60: 391-406.
- Hurrell, R.F., Lynch, S., Bothwell, T y col. 2004.** Enhancing the absorption of fortification iron. *INT. J. Vitam. Nutr. Res.* 74: 387-401.
- Hurrell, R.F., Lynch, S., Bothwell, T. Cori, H., Glahn, R., Hertrampf, E., Kratky, Z., Miller, D., Rodenstein, M., Streekstra, H., Teucher, B., Turner, E., Yeung, C.K., Zimmermann, M.B. 2004.** Enhancing the absorption of fortification iron. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74(6), 387-401.
- Institute of Medicine. 2000.** Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese,

Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, D.C.: National Academy Press (www.nap.edu/catalog/10026.html).

- Iost, C., Name, J.J., Jeppsen, R.B., Ashmead, H.D. 1998.** Repleting haemoglobin in iron deficiency anaemia in young children through liquid milk fortification with bioavailable iron amino acid chelate. *J. Am. Coll. Nutr.* 17: 187-194.
- Istre, G.R., Conner, J.S., Broome, C.V., Hightower, A., Hopkins, R.S. 1985.** Risk factors for primary invasive *Haemophilus influenzae* disease: increased risk from day care attendance and school-aged household members. *J. Pediatr.* 106: 190-195.
- Jacob, R.A., Wu, M.M., Henning, S.M., Swendseid, M.E. 1994.** Homocysteine increases as folate decreases in plasma of healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. *J. Nutr.*; 124, 1072-80.
- Jacobs, A. 1985.** Iron deficiency and iron overload. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 3: 143-186.
- Jacobson, S.W., Chiodo, L.M., Jacobson, J.L. 1999.** Breastfeeding effects on intelligence quotient in 4- and 11-year-old children. *Pediatrics.* 1999;103(5).
- Jacoby, B.T. and Henry, F.T. 1992.** Liquid chromatographic determination of folic acid in infant formula and adult medical nutritional. *J. AOAC Internat.* 75: 891-898.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. 1996.** Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93:7-9.
- Jain, N.C. 1993.** Essentials of veterinary haematology. Philadelphia, PA: Lea & Febiger: 173-175.
- Jensen, R. 1995.** Handbook of milk composition. Academic Press: San Diego.
- Jeppsen, R.B. 2001.** Toxicology and safety of ferrous bis-glycinate chelate and other iron amino acids chelates. *Arch. Latinoam. Nutr.* 51: 26-34.
- Johnson, D.B. 1997.** Nutrition in infancy: evolving views on recommendations. *Nutrition today* 32(2): 63-68.
- Johnston, K. L., Johnson, D. M., Marks, J., Srail, S. K., Debnam, E. S., Sharp, P. A. 2006.** Non-haem iron transport in the rat proximal colon. *Eur. J. Clin. Invest.* 36(1): 35-40.
- Kamal-Eldin, A., Mäkinen, M., Lampi, A.M., Hopia, A. 2002.** A multivariate study of α -tocopherol and hydroperoxide interaction during the oxidation of methyl linoleate. *European Food Research and Technology.* 214: 52-57.
- Kaneko, J. J. 1989.** Clinical biochemistry of domestic animals. Academic Press Inc. P. 894.
- Kang S.S, Zou J, Wong P.W.K, Kowalisyn J, Strokosch G. 1988.** Intermediate homocysteinemia: A thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 43:414-421.
- Kang, S.S., Wong, P.W.K., Susmano, A., Sora, J., Norosis, M., Ruggie, N. 1991.** Thermolabile MTHFR: an inherited risk factor for coronary artery disease. *American Journal of Human Genetics*, 48, 536-545.
- Kauwell GPA, Wilsky CE, Cerda JJ, Herrlinger-Garcia K, Hutson AD, Theriaque DW, Boddie A, Rampersaud GC, Bailey LB. 2000.** Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C3T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. *Metabolism* 49:1440-1443.
- Keagy, P.M. 1985.** Folic acid: microbiological and animal assays. In: Augustin, J., Klein, B.P., Venugopal, P.B. (Eds.). *Method of Vitamin Assay*, fourth ed. Wiley, New York, pp. 445-471.
- Keagy, P.M. 1990.** Animal assays for folate bioavailability: a critical evaluation. In: *Folic Acid Metabolism in Health and Disease* (Picciano, M.F., Stokstad, E.L.R., Gregory, J.F., eds.). 139-150. Wiley-Liss, New York.
- Keagy, P.M., Oace, S.M. 1982.** Development of a folic acid bioassay in rats. *J. Nutr.* 112: 87-91.

- Keagy, P.M., Oace, S.M. 1984.** Folic acid utilization from high fiber diets in rats. *J. Nutr.* 114: 1252-1259.
- Keagy, P.M., Oace, S.M. 1989.** Rat bioassay of wheat bran folate and effects of intestinal bacteria. *J. Nutr.* 119: 1932-1939.
- Keagy, P.M., Shane, B., Oace, S.M. 1988.** Folate bioavailability in humans: effects of wheat bran and beans. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 80-88.
- Kersletter, J.E., Mitnick, M., Gundberg, C.M y col. 1999.** Changes in the bone turnover in young women consumer different levels of dietary protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 1052-1055.
- Kiely, M., Flynn, A., Harrington, K. E., Robson, P. J., O'Connor, N., Hannon, E. M., O'Brien, M. M., Bell, S., Strain, J. J. 2001.** The efficacy and safety of nutritional supplement use in a representative sample of adults in the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutrition* 4, 1089-1097.
- Kim, Y.I. 1999.** Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects. *Nutr. Rev.* 57, 314-321.
- Kim, Y.S., Strand, E., Dickmann, R., Warthesen, J. 2000.** Degradation of vitamin A palmitate in corn flakes during storage. *J. Food Sci.* 65 (7): 1216-1219.
- Klagsbrun, M. 1978.** Human Milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. *Proc. Nat Acad Sci.* 75: 5057-5061.
- Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Fagundes Neto, U., Gopalan, K., Hernell, O., Hock, Q.S., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., Pzyrembel, H., Ramirez-Mayans, K., Shamir, R., Turck, D., Yamashiro, Y., Zong-Yi, D. 2005.** Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41:584–599. November 2005 ESPGHAN Committee on Nutrition.
- Konings, E.J. 1999.** A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *J AOAC Int.*; 82(1):119-27.
- Koury, M.J., Ponka, P. 2004.** New insights into erythropoiesis: The roles of folate, Vitamina B12, and iron. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 105-131.
- Kramer, M.S., Guo, T., Platt, R.W., y col. 2003.** Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. *Am J Clin Nutr.* 78 :291 –295
- Krauser, L.J., Forsberg, C.W., O'Conner, D.L. 1996.** Feeding human milk to rats increases bifidobacterium in the cecum and colon which correlates with enhanced folate status. *J. Nutr.* 126: 1505-1511.
- Kreuzer, M., Kirchgessner, M. 1991.** Endogenous iron excretion. A quantitative means to control iron metabolism?. *Biol. Trace Elem. Res.* 29(2):77-92
- Krul, C.A.M. 2001.** Mutagenic and antimutagenic activity of food compounds: application of a dynamic in vitro gastrointestinal model. Doctoral thesis 2001. University of Uthrecht, Fedodruk Bv Enschede, The Netherlands.
- Kwolek, W.F. y Bookwalter, G.N. 1971.** Predicting storage stability from time-temperature data. *Food Techn.* 25 (10), 1025, 1026, 1028, 1029, 1031, 1037.
- Labuza, T.P. 1982.** Shelf-life dating of foods. Ed. Food & Nutrition Press, Inc. Westport, Connecticut 06880, EE.UU.
- Labuza, T.P. 2000.** FScN 8334. Reaction Kinetics of food deterioration.
- Lucas, A. 1998.** Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr.* 128. (Suppl.): 401S-406S.
- Lai, D. y Heldman, D.R. 1982.** Analysis of kinetics of quality changes in frozen foods. *J. Food Proc. Eng.* 6, 179-200.
- Laing, B.M., Schlueter, D.L., Labuza, T.P. 1978.** Degradation Kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity. *J. Food Sci.* 43(5): 1440-1443.

- Lathrop, P.J., Leung, H.K. 1980.** Rates of ascorbic acid degradation during thermal processing of canned peas. *J. Food Sci.* 45: 152-153.
- Lau, B.L.T., Kakuda, Y., Arnott, D.R. 1986.** Effect of milk fat on the stability of vitamin A in ultra-high temperature milk. *J. Dairy Sci.* 69(8): 2052-2059.
- Laurence, K., James, N., Miller, M., Tennant, G. & Campbell, H. 1981.** Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *British Medical Journal* 282, 1509-1511.
- Layrisse, M., García-Casal, M.N. 1997.** Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. *Nutr. Rev.* 55: 233-239.
- Layrisse, M., García-Casal, M.N., Solano, L., Barón, M.A., Arguello, F., Llovera, D. Ramírez, J., Leets, I., Tropper, E. 2000.** Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bisglycinate chelate, phytates and polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2195-2199.
- Le Maguer, I., Jackson, H. 1983.** Stability of vitamin A in pasteurized and ultra-high temperature processed milks. *J. Dairy Sci.* 66: 2452-2458.
- Leclère, J., Birloues-Aragon, I., Méli, M. 2002.** Fortification of milk with iron-ascorbate promotes lysine glycation and tryptophan oxidation. *Food Chem.* 76: 491-499.
- Lee, H.S., Coates, G.A. 1999.** Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: A storage study. *Food Chemistry.* 65: 165-168.
- Leichter J., Landymore A.F., Krumdieck C.L. 1979.** Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effects on the determination of free folate content. *Am J Clin Nutr.* 32: 92-95.
- Lešková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Košická, M., Porubská, J., Holčíková, K. 2006.** Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis.* 19: 252-276.
- Levander, O.A., Cheng, L. 1980.** Micronutrient interactions: Vitamins, Minerals, and Hazardous Elements. N.Y. Acad. Sci, New York.
- Li, Z., Ren, A., Zhang, L., Ye, R., Li, S., Zheng, J., Hong, S., Wang, T. & Li, Z. 2006.** Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4-county area in Shanxi Province, China. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 76, 237-240.
- Libuza, T.P., Riboh, D. 1982.** Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *J. Food Sci.* 36: 66-74.
- Light, W. R., 3rd, Olson., J. S. 1990.** Transmembrane movement of heme. *J. Biol. Chem.* 265: 15623-15631.
- Lijun, Pei, y col. 2005.** Reduced folate carrier gene is a risk factor for neural tube defects in Chinese population: *Birth Defects research* 73: 430-433.
- Lin, C.K., Lin, J.S., Chen, S.Y., Jiang, M.L., Chiu, C.F. 1992.** Comparison of haemoglobin and red blood cell distribution width in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116: 1030-1032.
- Lindenbaum, J., Allen, R.H. 1995.** Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency. In: *Folate in Health and Disease* /Bailey, L.B., ed.), Marcel Dekker, New York.
- Loftin, M., Mannar, M. G. V., Merx, R. J, H, M., Naber-van den Heuvel, P. 1996.** Micronutrient fortification of foods: Current Practices, Research, and Opportunities. Ottawa, Ont.: MII/IAC.
- Lönnerdal, B. 1988.** Vitamin-mineral interactions. In *Nutrient Interactions.* (C.E Bodwell and J.W. Erdman, Eds.), pp. 163-186. Marcel Decker, New York.
- Lönnerdal, B. 1989.** Dietary factors affecting trace element absorption in infants. *Act. Paed. Sc. (Suppl.)*. 351: 109-113.
- Lönnerdal, B. 1997.** Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiol. Rev.* 77: 643-669.

- Lozoff B, Wachs TD. 2001.** Functional correlates of nutritional anemias in infancy and early childhood -child development and behavior. En: Ramakrishnan U, editor. Nutritional Anemias. Boca Raton: CRC Press; p.70-88.
- Lozoff, B., De Andraca, I., Castillo, M., Smith, J., Walter, T., Pino, P. 2003.** Behavioral and development effects of preventing iron-deficiency anaemia in healthy full-term infants. *Pediatrics*. 112: 1-9.
- LSRO. Life Science Research Office. 1998.** LSRO report: assessment of nutrient requirements for infant formulas. Washington, D.C.: Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration Department of Health and Human Services.
- Lucock, M. 2000.** Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular Genetics and Metabolism*. 71: 121-138.
- Lund, D.B. 1983.** Considerations in modelling food processes. *Food Technol.*, Jan, 92-94.
- Lynch, S. R., Cook, J. D. 1980.** Interaction of vitamin C and iron. *Ann. NY Acad. Sci*; 355: 32-44.
- Lynch, S. R., Green, A. 2001.** Assessment of nutritional anemias. in *Nutritional Anemias*, pp. 24-43. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Lynch, S. R., Skikne, B.S., Cook, J. D. 1989.** Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. *Blood*; 74: 2187-2193.
- Magnusson, B., Bjorn-Rasmussen, E., Hallberg, L., Rossander, L. 1981.** Iron absorption in relation to iron status. *Scand. J. Haematol*. 27: 201-208.
- Mahoney, A.W., Hendricks, D.G. 1982.** Efficiency of hemoglobin regeneration as a method of assessing iron bioavailability in food products. In: *Nutritional bioavailability of iron*. ACS Symposium series 203; Kies C (ed.) American Chemical Society, Washington DC, pp. 1-10.
- Mahoney, A.W., Van Orden, C.C., Hendricks, D.G. 1974.** Efficiency of converting food iron into haemoglobin by the anemic rat. *Nutr. Metabol*. 17: 223-230.
- Mahu, J.L., Leclercq, C., Suquet, J.P. 1990.** Usefulness of red cell distribution width in association with biological parameters in an epidemiological survey of iron deficiency in children. *Int. J. Epidemiol*. 19: 646-654.
- Marchetti, M., Ashmead, H.W., Tossani, N., Marchetti, S., Ashmead, S.D. 2000.** Comparison of the rates of vitamin degradation when mixed with metal sulphates or metal amino acid chelates. *J. Food Comp. Anal*. 13: 875-884.
- Marfo, E.K., Simpson, B., Idowu, J.S., Oke, O.L. 1990.** Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *J. Agr. Food Chem*. 38: 1580-1585.
- Marild, S., Hansson, S., Jodal, U., Oden, A., Svedberg, K. 2004.** Protective effect of breastfeeding against urinary tract infection. *Acta Paediatr*. 93 :164 –168
- Martin, C.A. 1995.** Folate analysis in foods - how accurate is it? *BNF Nutrition Bulletin* 20, 8-15.
- Martin, C.A. 1999.** The quantification and bioavailability of food folate. Ph.D. Thesis. National University of Ireland.
- Martinez, C., Fox, T., Eagles, J., Fairweather-Tait, S. 1998.** Evaluation of iron bioavailability in infant weaning foods fortified with haem concentrate. *J. Ped. Gastroent. Nutr*. 27: 419-424.
- Martínez, C., Ros, G., Periago, M. J. 2000.** Biodisponibilidad mineral (I): Hierro y Cinc. *Rev. Cién. (IEB)*. 25-26: 23-36.
- Martínez, M.J. y Hernandez, M. 1993.** Necesidades nutricionales en la primera infancia. En: *Alimentación infantil*. 2ed. Díaz de Santos. Madrid, España. Pp. 25-31.
- Mason JB., 1990.** Intestinal transport of monoglutamyl folates in mammalian systems. In: Picciano MF, Stokstad ELR., Gregory JF III, eds. *Folic acid metabolism in health and disease*. New York: Wiley- Liss: 47-64.

- Mastroiolo, W.** and Wilson, M.A. 1993. Effect of light on serum B12 and folate stability. *Clin. Chem.* 39:913.
- McCarthy, D.A., Kakuda, Y., Arnott, D.R.** 1986. Vitamin A stability in ultra-high temperature processed milk. *J. Dairy Sci.* 69(8): 2045-2051.
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hedinger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J.** 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291, 1755-1759.
- McKie, A.T., Latunde-Dada, G.O., Miret, S., McGregor, J.A., Anderson, G.J., Vulpe, C.D.** 2002. Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport. *Biochemical Society Transactions.* 30, 722-724.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., Simpson, R.J.,** 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* 5, 299-309.
- McLaughlin, J.M., Campbell, J.A.** 1999. Methodology of protein evaluation. In Munro H (ed.): *Mammalian Protein Metabolism*. New York, Academia Press. 969: 391-422.
- McVea, K.L., Turner, P.D., Pepler, D.K.** 2000. The role of breastfeeding in sudden infant death syndrome. *J Hum Lact.* 16 :13 –20
- Medical Research Council Vitamin Study Research Group,** 1991. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338, 131-137.
- Mehta, N.R., Jones, J.B., Hamosh, M.** 1982. Lipases in preterm human milk ontogeny and physiologic significance. *J. Pediatr. Gastroenterol.* 1: 317-326.
- Meier, P. J., Giger, U., Brandli, O., Fehr, J.** 1981. Acquired, vitamin B₆-responsive, primary sideroblastic anemia, an enzyme deficiency in heme synthesis. *Schweiz. Med. Wochenschr;* 111: 1533-1535.
- Melse-Boonstra, A., West, C.E., Katan, M.B., Kok, F.J. and Verhoef, P.,** 2004. Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition,* 79, 424-429.
- Melse-Boonstra A.** 2003. Dietary folate: Bioavailability studies in humans. Doctoral Thesis.
- Miller, S.A.** 1989. Problems Associated with the Establishment of Maximum Nutrient Limits in Infant Formula. *J. Nutr.* 119: 1764-1767.
- Miller, W.M., Nadeau, M.R., Smith, D., Selhub, J.** 1994a. Vitamin B6 deficiency vs folate deficiency: comparison of response to methionine loading in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 1033-1039
- Miller, W.M., Nadeau, M.R., Smith, J., Smith, D., Selhub, J.** 1994b. Folate deficiency induced homocysteinemia in rats: Disruption of S-adenosyl methionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem. J.* 298: 415-419.
- Milner, J.A.** 1990. Trace mineral in the nutrition of children. *J. Pediatr.* 117(Suppl.): 147S-155S.
- Min, D.B., Boff, J.M.** 2002. Chemistry and reactions of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* July 1(2): 58-72
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., Huis in 't Veld, J.H.J.** 1995. A multicompartimental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Atla* 23: 197-209.
- Miret, S., Simpson, R.J., McKie, A.T.** 2003. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Ann. Rev. Nutr.* 23: 283-301.
- Moffatt, M.E., Longstaffe, S., Besant, J., Dureski, C.** 1994. Prevention of iron deficiency and psychomotor decline in high-risk infants through use of iron-fortified formula: a randomized clinical trial. *J. Pediatr.* 125: 527-534.
- Moreno-Villares, J.M., Galiano Segovia, M.J.** 2006. Recientes avances en fórmulas infantiles. *Rev. Pediatr. Aten. Primaria.* 8 Supl. 1: S37-S49.
- Morgan, E.H., Oates, P.S.** 2002. Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 29(3): 384-399.

- Nail, P.A., Thomas, M.R., Eakin, R. 1980.** The effect of thiamin and riboflavin supplementation on the level of those vitamins in human breast milk and urine. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 198-204.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995.** How to define and determine reference in the clinical laboratory. Approved guidelines. NCCLS document C28-A. Villanova, PA: NCCLS.
- Natta, C. L., Reynolds, R. D. 1984.** Apparent vitamin B₆ deficiency in sickle cell anemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 235-239.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J y col. 2004.** Hcpidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306: 2090-2093.
- Nemeth, E., Valore, E.V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., Ganz, T. 2003.** Hcpidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 101: 2461-2463.
- Nestél, P. 1993.** Food fortification in developing countries. New York: USAID/VITAL.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L y col. 2002.** The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hipoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* 110: 1037-1044.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis. 2001.** Prevention, Diagnosis and Therapy. *JAMA.* 285: 785-795.
- Nourian, F., Ramaswamy, H.S., Hendrickx, H.M. 2003.** Kinetics of quality change associated with potatoes stored at different temperaturas. *Labensmittel Wissenschaft und Technologie.* 36: 49-65.
- O'Connor, D.L. 1991.** Interaction of iron and folate during reproduction. *Prog. Food Nutr. Sci.* 15: 231-254.
- O'Leary, K., Sheehy, P.J.A. 2001a.** Effects of preparation and cooking of folic acid fortified foods on the availability of folic acid in a folate depletion-repletion rat model. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4508-4512.
- O'Leary, K., Sheehy, P.J.A. 2001b.** Influence of folic acid fortified foods on folate status in a folate depletion-repletion rat model. *Br. J. Nutr.* 85: 441-446.
- O'Leary, K., Sheehy, P.J.A. 2002.** Plasma, liver and kidney folate ans plasma homocysteine concentrations are poor response variables at very low dietary folate intake, in a folate depletion/repletion rat model. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53: 35-42.
- Oates, P. S., Morgan, E. H. 1996.** Effects of dietary iron loading with carbonyl iron and of iron depletion on intestinal growth, morphology, and expression of transferrin receptor in the rat. *The anatomical record.* 246: 364-371.
- Oddy, W.H., Peat, J.K., de Klerk, N.H. 2002.** Maternal asthma, infant feeding, and the risk of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 110 :65 –67
- Oddy, W.H., Sly, PD., de Klerk, NH., y col. 2003.** Breast feeding and respiratory morbidity in infancy: a birth cohort study. *Arch Dis Child.* 88 :224 –228
- Ofori-Nkansah, N., Weissenfels, I., Pribilla, W. 1975.** Vitamin B₆ deficiency anemia. *Schweiz. Med. Wochenschr.;* 105: 1319-1324.
- Olivares, M. Pizarro, F., Pineda, O., Name, J.J., Hertrampf, E., Walter, T. 1997.** Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycinate chelate bioavailability in humans. *J..Nutr.* 127: 1407-1411.
- Olivares, M., Pizarro, F. 2001.** Bioavailability of iron bisglycinate chelate in water. *Arch. Latinoam. Nutr.* 51: 22-25.
- Oski, F. A. 1995.** Anemia due to other nutritional deficiencies. In: Williams, W. J., Beutler, E., eds. *Hematology.* New York: McGraw-Hill, 511-515.
- Oski, F.A. 1993.** Iron deficiency in infancy and childhood. *N. Engl. J. Med.* 329: 190-193.
- Osman, A.K., Al-Othaimeen, A. 2002.** Experience with ferrous bis-glycinate chelate as an iron fortificant in milk. *Int. J. Vitam. Res.* 72: 257-263.
- Ottaway, P.B. 2002.** The stability of vitamins during food processing: vitamin K. IN: Henry, C.J.K.,

- Chapman, C. (Eds.), *The Nutrition Handbook for Food Processors*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 247-264.
- Owen, C.G., Whincup, P.H., Odoki, K., Gilg, J.A., Cook, D.G. 2002.** Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*. 110 :597 –608
- Park, C.H., Bacon, B.R., Brittenham, G.M., Tavill, A.S. 1987.** Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Lab. Invest.* 57: 555-563.
- Parmley, R.T., Barton, J.C., Conrad, M.E., Austin, R.L., Holland, R.M., 1981a.** Ultrastructural cytochemistry and radioautography of hemoglobin-iron absorption. *Exp. Mol. Pathol.* 34. 131-144.
- Peirano P, Algarín C, Garrido M, Roncagliolo M, Lozoff B. 2001.** Interaction of iron deficiency anemia and neurofunctions in cognitive development. En: Fernstrom JD, Uauy R, editores. *Nutrition and brain*. Basel: Nestec; p.19-39. Nestlé Nutrition Workshop Series Clinics and Performance Program.
- Perez-Bravo, E., Carrasco, E., Guitierrez-Lopez, M.D., Martinez, M.T., Lopez, G., de los Rios, M.G. 1996.** Genetic predisposition and environmental factors leading to the development of insulin-dependent diabetes mellitus in Chilean children. *J Mol Med.* 74 :105 –109
- Perry, J. And Chanarin, I., 1970.** Intestinal Absorption Of Reduced Folate Compounds In Man. *British Journal Of Hematology* 18, 329-339.
- Pettit, D.J., Forman, M.R., Hanson, R.L., Knowler, W.C., Bennett, P.H. 1997.** Breastfeeding and the incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians. *Lancet.* 350 :166 –168
- Pfeiffer, C. M., Rogers, L. M., and Gregory, J. F. 1997.** Improved analysis of folate in cereal- grain food products using tri- enzyme extraction and combined affinity and reverse phase liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 45: 407-413.
- Philpott, N., Kelleher, B.P., Smith, O.P., O'Broin, S.D. 2001.** High serum folates and the simplification of red cell folate analysis. *Clin. Lab. Haem.* 23: 15-20.
- Picciano, M.F. 1995.** Water-soluble vitamins in human milk. In: Jensen RG, editor. *Handbook of milk composition*. New York: Academic Press. p 189-194.
- Pietrzik K, Bohlmann AM, Fohr I, Prinz-Langenohl R, Nau H. 2001.** %-MTHF versus PGA- GAT is the better alternative for supplementation? *FASEB Journal, Experimental Biology, A* 611.
- Piironen, V., Varo, P., Koivistoinen, P. 1988.** Stability of tocopherol and tocotrienols during storage of foods. *Journal of Food Composition and Analysis.* 1: 124-129.
- Pintó, X., Vilaseca, M.A., Balcells, S., Artuch, R., Corbella, E., Meco, J.F., Vila, R., Pujol, R., Grinberg, D. 2005.** A folate diet is as effective as folic acid from supplements in decreasing plasma homocysteine concentrations. *Int. J. Med. Sci.* 2(2): 58-63.
- Pirzio-Biroli, G., Bothwell, t.H., Finch, C.A. 1958.** Iron absorption. II. The absorption of radioiron administrated with a standard meal in man. *J. Lab. Clin. Med.* 51: 37-48.
- Pisacane, A., De Vizia, B., Valiente, A., Vaccaro, F., Russo, M., Grillo, G., Giustradi, A. 1995.** Iron status in breast-fed infants. *J. Pediatr.* 127: 429-431.
- Pitkin, R.M. 2007.** Folate and neural tube defects. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(suppl):285S– 8S.
- Pizarro, F., Olivares, M., Hertrampf, E., Mazariegos, D.L., Arredondo, M., Letelier, A., Gidi, V. 2002.** Iron bis-glycinate chelate competes for the nonheme iron absorption pathway. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 577-581.
- Pizarro, F., Yip, R., Dallman, P.R., Olivares, M., Hertrampf, E., Walter, T. 1991.** Iron status with different infant feeding regimens: relevance to screening and prevention of iron deficiency. *J. Pediatr.* 118: 687-692.
- Priestley, R.J. 1979.** Vitamins, in *Effect of heat processing on food stuffs*, ed by Priestley R.J. Applied Science Publishers, London, pp. 121-156.

- Prinz-Langenohl, R., Brönstrup, A., Thrand, B., Hages, M., Pietrzik, K. 1999.** Availability of food folate in humans. *J. Nutr.* 129: 913-916.
- Qiu, A., Jansen, M., Safaris, A y col. 2006.** Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell.* 127: 917-928.
- Queiroz, S., Torres, M. 1995.** Iron deficiency anemia: Physiopathological aspects and experiment with the use of iron enriched milk. *Ped. Mod.*31.
- Quinlivan, E.P., Hanson, A.D., Gregory, J.F. 2006.** The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 348, 163-184.
- Ramakrishnan, U., Huffman, S. 2001.** Multiple micronutrient malnutrition – what can be done? In: *Nutrition and Health in Developing Countries* (Semba, R.D. & Bloem, M., eds.), pp. 365-392. Humana Press, Tatawa, N.J.
- Ramakrishnan, U., Neufeld, L.M., Gonzalez-Cossío, T., Villalpando, S., García-Guerra, A., Rivera, J., Martorell, R. 2004.** Multiple micronutrient supplements during pregnancy do not reduce anemia or improve iron status compared to iron-only supplements in semirural Mexico. *J. Nutr.* 134: 898-903.
- Ramaswami, H.S., Van de Voort, F.R., Ghasal, S. 1989.** An análisis of TDT and arrhenius methods for handling process and kinetic data. *J. Food Sci.* 54: 1322-1326
- Ratnam M, Freisheim JH 1990.** Proteins involved in the transport of folates and antifolates by normal and neoplastic cells. In: Picciano M.F, Stokstad ELR, Gregory JF, eds. *Contemporary Issues in Clinical Nutrition*. Vol. 13. Folic acid Metabolism in Health and Disease. New York: Wiley- Liss,; 91-120.
- Rebello, T. 1987.** Trace enrichment of biological folates on solid-phase adsorption cartridges and analysis by high- pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 166: 55-64.
- Reeves, P.G. 1997.** Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.* 127(5 Suppl):838S-841S.
- Refsum, H., Smith, A.D., Ueland, P.M., Nexø, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C, Scott, J.M. 2004.** Facts and recommendations about Total homocysteine determination: An expert opinion. *Clinical chemistry*, 50:1;3-32.
- Refsum, H., Ueland, P.M., Nygård, O. & Vollset, S.E. 1998.** Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine* 49, 31-62.
- Reingold, R.N. and Picciano, M.F. 1982.** Two improved high- performance liquid chromatographic separations of biologically significant forms of folate. *J. Chromatogr.* 234: 171-179.
- Reisenauer, A. and Halsted, C., 1987.** Human folate requirements. *Journal of Nutrition*, 117, 600-602.
- Renken, S.A., Warthesen, J.J. 1993.** Vitamin D stability in milk. *J. Food Sci.* 58 (3): 552-555.
- Renner, E.M. 1989.** Micronutrients in milk and milk-based products. Pp. 239-243.
- Reynolds, E.H. 2002.** Bebefits and risk of folic acid to the nervous system; *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*; 72, 567-571.
- Reynolds, A. 2001.** Breastfeeding and brain development. *Pediatr Clin North Am.* 48 :159 – 171
- Riddell, L.J., Chisholm, A., Williams, S., Mann, J.L. 2000.** Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.*; 71, 6: 1448-54.
- Rimm, E.B., Willett, W.C., Hu, F.B., Sampson, L., Colditz, G.A., Manson, J.E., Hennekens, C., Stampfer, M.J. 1998.** Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *J. Am. Med. Assoc.* 279, 359-364.
- Riva, E., Verduci, E., Agostoni, C., Giovannini, M. 2007.** Comparison of the nutritional values of follow-on formulae available in Italy. *The Journal of International Medical Research.* 35: 20-37.

- Rivero Urgell, M., Santamaría Orleans, A., Rodríguez-Palmero Seuma, M. 2005.** La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. *Nutr. Hosp.* 20: 135-146.
- Roberts, G.T., El Badawi, S.B. 1985.** Red blood cell distribution width index in some hematologic diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 83: 222-226.
- Robertson, G.L., Samaniego, C.M.L. 1986.** Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage. *J. Food Sci.* 51(1): 184-187
- Robinson, K., Arheart, K., Refsum, H., Brattstrom, L., Goers, G., Ueland, P., Rubba, R., Palma-Reis, R., Meleady, L., Daly, L., Witteman, J., Graham, I. 1998.** Low circulation folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. *Circulation*, 97, 437-443.
- Rogers, L.M., Pfeiffer, C.M., Bailey, L.B. and Gregory, J.F. 1997.** A dual-label stable-isotopic protocol is suitable for determination of folate bioavailability in humans: evaluation of urinary excretion and plasma folate kinetics of intravenous and oral doses of (13C5) and (2H2) folic acid. *Journal of Nutrition* 127, 2321-2327.
- Rong, N., Selhub, J., Goldin, B.R., Rosenberg, I.H. 1991.** Bacterially synthesized folate in rat large intestine is incorporated into host tissue folylpolyglutamates. *J. Nutr.* 121: 1955-1959.
- Ros, L., Tormo, R., Morán, J. 1993.** Composition in infant milk formulas: side effects. *Proceedings, 11th International Symposium on New Perspectives in Infant Nutrition*, Murcia 469-485.
- Rosenberg IH, Rosenberg LE. 1998.** The implications of genetic diversity for nutrient requirements: The case of folate. *Nutr Rev* 56: S47-S53.
- Ruíz, M.C., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., Lagarda, M.J. 1996.** Calcium, magnesium, sodium, potassium and iron content of infant formulas and estimated daily intakes. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 10: 25-30.
- Saarinen, U. M., Siimes, M. A., Dallman, P. R. 1977.** Iron absorption in infants: high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J. Pediatr.* 91(1): 36-39.
- Sachdev, H. Gera, T., Nestel, P. 2005.** Effect of iron supplementation on mental and motor development in children: systematic review of randomized controlled trials. *Public Health Nutr.* 8: 117-132.
- Saguy, I. y Karel, M. (1980).** Modeling of quality deterioration during food processing and storage. *Food Technol.* 34 (2), 78-85.
- Sakaguchi, N., Rao, T.P., Nakata, K., Nanbu, H. Juneja, L.R. 2004.** Iron absorption and bioavailability in rats of micronized dispersible ferric pyrophosphate. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74: 3-9.
- Sandstrom, B. 2001.** Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br. J. Nutr.* 85 (suppl. 2): S181-S185.
- Sant, P.V., Kusters, P.F.M.M., Harthoorn-Lasthuizen, E.J. 1997.** Dependency of MCV and haemoglobin concentration on plasma vitamin B12 levels in relation to sex and age. *Clin. Lab. Haematol.* 19: 27-31.
- Satter, A., deMan, J.M., 1975.** Photooxidation of milk and milk products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7: 13-37.
- Sauberlich, H. E., Kretsch, M. J., Skala, J. H., Johnson, H. L. & Taylor, P. C. 1987.** Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 1016-1028.
- Sauberlich, H. E., Kretsch, M. J., Skala, J. H., Johnson, H. L. & Taylor, P. C. 1987.** Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 1016-1028.
- Savage, D.G. and Lindenbaum, J.L., 1995.** Folate-cobalamin interactions. IN: *Folate in Health and Disease*, pp. 237-285. (LB Bailey, editor). New York, Marcel Dekker.

- Saylor, L., Finch, C.A. 1953.** Determination of iron absorption using two isotopes of iron. *Am. J. Physiol.* 172: 372-376.
- SCF. Scientific Committee for Food. 1983.** First report on the essential requirements of infant formula and follow-up milks based on milk protein. Opinion expressed at Reports of the Scientific Committee for Food, Fourteenth Series. European Commission, Luxembourg
- SCF. Scientific Committee on Food. 1993.** Nutrient and energy intakes for the European Community. Reports of the Scientific Committee for Food. European Commission, Luxembourg.
- SCF. Scientific Committee on Food. 2003.** Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formula and Follow-on Formula. Adopted 4 April 2003. 85 p.
- Schanler, R.J., Shulman, R.J., Lau, C. 1999.** Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics.* 103: 1150-1157.
- Schirch, V. 1997.** Enzymatic determination of Folylpolyglutamate pools. *Methods Enzymol.* 281: 77-81.
- Schlemmer, U. 1995.** Bioavailability of nutrients. Conceptual aspects of definition and problems of determination. *Br. J. Nutr.* 73: 150-151.
- Scott, J. & Weir, D. 1996.** Homocysteine and cardiovascular disease. *QJM – Monthly Journal of the Association of Physicians* 89, 561-563.
- Scott, K.J., Bishop, D.R., Zechalko, A., Edwards-Webb, J.D., Jackson, P.A., Scuffam, D. 1984.** Nutrient content of liquid milk. II. Content of vitamin C, riboflavin, folic acid, thiamin, vitamin B₁₂ and B₆ in pasteurized milk as delivered to the home and after storage refrigerator. *Journal of Dairy Research.* 51: 51-57.
- Selhub, J., Jacques, P.F., Bostom, A.G., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W., Belanger, A.J., O'Leary, D.H., Wolf, P. A., Schaefer, E.F., Rosenberg, I.H. 1995.** Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N. England J. Med.*; 332:286-91.
- Selhub, J. y Rosenberg, I.H. 1996.** Folic Acid. In *Present knowledge in Nutrition.* Eds. E.E. Ziegler & L.J. Filer). ILSI Press. Washington DC, pp. 206-219.
- Selhub, J., Jacques, P.F., Bostom, A.G., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W.F., Belanger, A.J., O'Leary, D.H., Wolf, P.A., Rush, D., Schaefer, E.J. & Rosenberg, I.H. 1996.** Relationship between plasma homocysteine, vitamin status and extracranial carotid-artery stenosis in the Framingham study population. *Journal of Nutrition* 126, S1258-S1265.
- Semchuk, G.M., Allen, O.B., O'Connor, D.L. 1994.** Folate bioavailability from milk containing diets is affected by altered intestinal biosynthesis of folate in rats. *J. Nutr.* 124: 1118-1125.
- Seyoum, E and Selhub, J. 1998.** Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *J Nutr* 128: 1956-1960.
- Shane, B. 1995.** Folate chemistry and metabolism. In: Balley LB, ed. *Folate I health and disease.* New York: Marcel Dekker. 1-22.
- Shane, B., Tamura, T. & Stokstad, E.L.R. 1980.** Folate assay: a comparison of radioassay and microbiological methods. *Clinica Chimica Acta* 100, 13-19.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G., Oakhill, J. S., Takeuchi, K., Laftah, A., Khan, Y., Warley, A., Halliday, N., McCann, F., Hider, R. C, et al. 2005.** Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 122: 789-801.
- Sierra, I., Vidal-Valverde, C. 2001.** Vitamin B1 and B6 retention in milk after continuous-flow microwave and conventional heating at high temperatures. *Journal of Food Protection.* 64 (6): 890-894.
- Singh, R.P. 1994.** Scientific principles of shelf-life evaluation. In: *Man CMD, Jones AA, editors. Shelf life evaluation of foods.* London. Blackie Academic & Professional. P. 3-25.

- Smuts, C.M., Dhansay, M.A., Faber, M., van Stuijvenberg, M.E., Swaneveider, S., Gross, R., Benadé, S. 2005.** Efficacy of multiple micronutrient supplementation for improving anemia, micronutrient status, and growth in South African infants. *J. Nutr.* 135: 653S-659S.
- Snowdon, D.A., Tully, C.L., Smith, C.D., Riley, K.P., Markesbery, W.R. 2000.** Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 993-998.
- Soini, E., Kojola, H. 1983.** Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates- a new generation of non-isotopic immunoassays. *Clin. Chem.* 29: 65-68.
- Splett, P.L. y Story, M. 1991.** Child nutrition: objectives for the decade. *J. Am. Diet. Ass.* 91: 665-668.
- Stadtman, E.R. 1991.** Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1125-1128.
- Steaven, R.T. 1988.** Vitamins and minerals, in *Principles of Food Science, Part I*, ed by Fenemma O.R. Marcel Dekker, New York, pp. 365-371.
- Steaven, R.T., Veron, R.Y., Michael, C.A. 1985.** Vitamins and Minerals, in *Food Chemistry*, 2nd edn, pp. 493-499.
- Stephensen, C.B. 2001.** Vitamin A, infection, and immune function. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 167-192.
- Stokes, P. L., Melikian, V., Leeming, R. L., Portman-Graham, H., Blair, J. A., Cooke, W. T. 1975.** Folate metabolism in scurvy. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 126-129.
- Strålsjö, L., Arkbåge, K., Witthöft, C.M. & Jägerstad, M. 2002.** Evaluation of a radioprotein-binding assay (RPBA) for folate analysis in berries and milk. *Food Chemistry* 79, 525-534
- Sullivan, P.B. 1993.** Cow's milk induced intestinal bleeding in infancy. *Arch. Dis. Child.* 68: 240-245.
- Suzuki, S., Iwata, G., Sutor, A. 2001.** Vitamin K deficiency during the perinatal and infantile period. *Semin. Thromb. Hemost.* 27: 93-98.
- Swain, J.H., Newman, S.M., Hunt, J.R. 2003.** Bioavailability of elemental iron powders to rats is less than bakery-grade ferrous sulphate and predicted by iron solubility and particle surface area. *J. Nutr.* 133: 3546-3552.
- Swanson, D.A., Liu, M.L., Baker, P.J., Garrett, L., Stitzel, M., Wu, J.M., Harris, M., Banerjee, R., Shane, B. & Brody, L.C. 2001.** Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1058-1065.
- Szarfarc, S.C., de Cassana, L.M.N., Fujimori, E., Guerra-Shinohara, E.M., de Oliveira, I.M.V. 2001.** Relative effectiveness of iron bis-glycinate chelate (Ferrochel) and ferrous sulphate in the control of iron deficiency in pregnant women. *Arch. Latinoam. Nutr.* 51: 199-203.
- Takala, A.K., Estola, J., Palmaren, J. y col. 1989.** Risk factors of invasive Haemophilus influenzae type b disease among children in Finland. *J. Pediatr.* 115: 694-701.
- Tamura, T., Stokstad, Elr. 1973.** The Availability Of Food Folate In Man. *Br J Haematol* 25: 513-532.
- Tamura, T., Mizuno, Y., Johnston, K.E., y Jacob, R.A. 1997.** Food folate assay with protease, α -amylase, and folate conjugase treatments. *J. Agric. Food Chem.* 45: 135-139.
- Tannenbaum, S.R., Young, V.R., Archer, M.C. 1993.** Vitamins and Minerales. In *Química de los Alimentos*. pp. 537-613 (Ed. O. R. Fennema). Zaragoza: Acribia.
- Taylor, P., Martinez-Torres, C., Leets, I., Ramirez, J., Garcia-Casal, M. N., Layrisse, M. 1988.** Relationships among iron absorption, percent saturation of plasma transferrin and serum ferritin concentration. *J. Nutr.* 118: 1110-1115.
- Thompson, D.K., Kharb, S. 2007.** Aspects of infant food formulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety*. 6: 79-102.
- Thu, B. D., Schultink, J.W. Dillon, D., Gross, R., Leswara, N. D., Knoi. H.H. 1999.** Effect of daily and weekly micronutrient supplementation on micronutrient deficiencies and growth of young

- Vietnamese children. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 80-86.
- Tojo, R., Pavon, P., Couce, M.L. y Antelo, J. 1987.** Calendario de alimentación: Interrelación entre necesidades nutricionales y el desarrollo y maduración psicomotora, intestinal y renal. En problemas de atención y prevención primaria en pediatría. Eds. Pombo, M. Y & Martínón, J.J. III Reunión de las Sociedades de Pediatría de Portugal, Asturias, Cantabria, Castilla-León. Santiago de Compostela, España.
- Tontisirin, K., Nantel, G., Bhattacharjee, L. 2002.** Food-based strategies to meet the challenges of micronutrient malnutrition in the developing world. *Proceedings of the Nutrition Society.* 61: 243-250.
- Tuthill, D.P., Cosgrove, M., Dunstan, F., Stuart, M.L., Wells, J.C.K., Davies, D.P. 2002.** Randomized double-blind controlled trial on the effects on iron status in the first year between a no added iron and standard infant formula received for three months. *Acta Paediatr.* 91: 119-124.
- Ubbink J.B. 1997.** The role of vitamins in the pathogenesis and treatment of hyperhomocyst (e) anaemia. *J. Inheret. Metab. Dis.;* 20: 316-25.
- Untoro, J., Karyadi, E., Wibowo, L., Erhardt, M.W., Gross, R. 2005.** Multiple micronutrient supplements improve micronutrient status and anemia but not growth and morbidity of Indonesian infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Nutr.* 135: 639S-645S.
- Vahteristo, L, y Finglas, P.M. 2000.** Chromatographic determination of folate. In: *Modern Chromatographic analysis of vitamins*, 3rd edn., A.P. de Leenheer, W.E. Lambert and J.F. Van Bocxlaer (eds.), Marcel Dekker, Inc: New York, pp. 301-323.
- Vahteristo, L., Finglas, P.M., Withöft, C., Wigertz, K., Seale, R. and de Froidmontgörtz, I. 1996.** Third EU MAT intercomparison study on food folate analysis using HPLC procedures. *Food Chem.* 57: 109-111.
- Van Boeckel, M.A.J.S. 1996.** Statistical aspects of kinetic modelling for food science problems. A critical review. *J. Food Sci.* 51: 172-175
- Van Dokkum, W. 1992.** Significance of iron bioavailability for iron recommendations. *Biol. Trace Elem. Res.* 35: 1-11.
- Van Moorsell, L. 1997.** Improving calcium and iron bioavailability through bioactive proteins. *International Food Ingredients.* 4: 44-46.
- Van Stuijverberg, M.E., Smuts, C.M., Wolmarans, P., Lombard, C.J., Dhansay, M.A. 2006.** The efficacy of ferrous bisglycinate and electrolytic iron as fortificant s in bread in iron deficient school children.
- Van Thuy, P.V., Berger, J., Davidsson, L., y col. 2003.** Regular consumption of NaFeEDTA fortified fish sauce improves iron status and reduces the prevalence of anemia in anemic Vietnamese women. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 284-290.
- Van Zeben, D., Bieger, R., Van Wermeskerken, R.K.A., Castel, A., Ermans, J. 1990.** Evaluation of microcytosis using serum ferritin and red blood cell distribution width. *Eur. J. Haematol.* 44: 106-109.
- Van't Veer, P., Jansen, M.C.J.F., Van Dusseldorp, M., Kok, F.J. 1997.** Relevantie van voedselverrijking: de visie van de epidemioloog. In: *Bespiegelingen over voor en tegen van oedselverrijking.* Ed. Van Binsbergen JJ., Van Dusseldorp M. Bohn Stafleu van Loghum, Houten/ Diegem:14-28.
- Varela-Moreiras, G. y Selhub, J., 1992.** Long-term folate deficiency alters folate content and distribution differentially in rat tissues. *Journal of Nutrition*, 122, 986-991.
- Vázquez-López, M.F., Carracedo-Morales, A., Muñoz-Vico, J., Morcillo-Llorens, R., Calvo-Bonachera, M.D., López-Muñoz, J y col. 2001.** Receptor sérico de la transferina en niños sanos. *An. Esp. Pediatr.* 55: 113-120.
- Velíšek, J. 1999.** *Chemie potravin 2.* OSSIS, Tábor, p.328.
- Verhaar M.C., Stroes E., Rabelink T.J. . 2002** Folate and cardiovascular diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:6-13.

- Verhoef, P., Stampfer, M.J., Buring, J.E., Gaziano, J.M., Allen, R.H., Stabler, S.P., Reynolds, R.D., Kok, F.J., Hennekens, C.H., Willet, W.C. 1996.** Homocysteine metabolism and risk myocardial infraction: relationship with vitamins B6, B12, and folate. *Am. J. Epidemiology.*; 134:845-59.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Havenaar, R., van den Berg, H., Witthöft C., Schaafsma, G. 2003.** Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J. Nutr.* 133: 2377-2383.
- Verwei, M., Freidig, A.P., Havenaar, R., Groten, J.P. 2006.** Predicted serum folate concentrations based on in vitro studies and kinetic modeling are consistent with measured folate concentrations in humans. *J. Nutr.* 136: 3074-3078.
- Vidal-Valverde, C., Redondo, P. 1993.** Effect of microwave heating on the thiamin content of cow's milk. *Journal of Dairy Research.* 60: 259-262.
- Vidal-Valverde, C., Ruiz, R., Medrano, A. 1992.** Stability of retinol in milk during frozen and other storage conditions. *Z. Lebensm Unters Forsch* 195: 562-565.
- Vidal-Valverde, C., Ruiz, R., Medrano, A. 1993.** Effects of frozen and other storage conditions on α -tocopherol content of cow milk. *J. Dairy Sci.* 76: 1520-1525.
- Vieira, M.C., Texeira, A.A., Silva, C.L.M. 2000.** Mathematical modeling of the thermal degradation kinetic of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *Journal of Food Engineering.* 43: 1-7.
- Viteri, F.E., García-Ibañez, R., Torun, B. 1978.** Sodium iron EDTA as an iron fortification compound in Central America. Absorption studies. *Am. J. Clin. NUtr.* 31: 961-971.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y.-M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G.J., 1999.** Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.* 21, 195-199.
- Wald, N.J., Watt, H.C., Law, M.R., Weir, D.G., McPartlin, J. & Scott, J.M. 1998.** Homocysteine and ischemic heart disease - Results of a prospective study with implications regarding prevention. *Archives of Internal Medicine* 158, 862-867.
- Walter T, Olivares M, Pizarro F, Muñoz C. 1997.** Iron, anemia, and infection. *Nutr Rev*; 55:111-24.
- Walter, T., Olivares, M., Pizarro, F., Hertrampf, E. 2001.** Fortification. In *Nutritional Anemia*, pp. 153-183.
- Wasserman, R.H. 1964.** Lactose stimulate absorption of calcium: A theory *Nature.* 201: 997-999.
- Weaver, C. M. 1998.** Use of calcium tracers and biomarkers to determine calcium kinetics and bone turnover. *Bone.* 22: 103S-104S.
- Wegmuller, R., Camara, F., Zimmermann, M.B., Adou, P., Hurrell, R.F. 2006.** Salt dual fortified with iodine and micronised ground ferric pyrophosphate affects iron status but not haemoglobin in children in Côte d'Ivoire. *J. Nutr.* 136: 1814-1820.
- Wei, M.M., Bailey, L.B., Toth, J.P., Gregory, J.F III. 1996.** Bioavailability of humans of deuterium-labelled monoglutamyl and polyglutamyl folates is affected by selected foods. *J. Nutrition*; 126: 3100-8.
- Wei, M.M., Gregory, J.F III. 1998.** Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border Pteroylpolyglutamate hydrolase in vitro: potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamate folate. *J. Agric. Food Chem*; 46: 211-9.
- Weintraub, L.R., Conrad, M.E., Crosby, W.H. 1965.** Regulation of the intestinal absorption of iron by the rate of erythropoiesis. *Br. J. Haematol.* 11:432-438.
- Welsh, J.K., Skurrie, I.J., May, J.T. 1978.** Use of Semiliki forest virus to identify lipid-mediated antiviral activity and anti-alphavirus

- immunoglobulin A in human milk infect immun. 19: 395-401.
- Wharton, B.A y Scott, P.H. 1996.** Distinctive aspects of metabolism and nutrition in infancy. Clin Biochem 29: 419-428.
- Wheby, M.S., Crosby, W.H. 1964.** The gastrointestinal tract and iron absorption. Blood. 22: 416-428.
- White, D.R., Lee, H.S. and Krüger, R.E. 1991.** Reversed-phase HPLC/EC determination of folate in citrus juice by direct injection with column switching. J. Agric. Food Chem. 39: 714-717.
- Whitehead VM. 1986.** Pharmacokinetics and physiological disposition of folate and its derivatives. In: Blakley RL, Whitehead VM, eds. Folate and Pterins. Vol. 3. New York: John Wiley and Sons.: 177-205.
- Whittaker, P.G., Dunkel, V. C., Bucci, T. J., kusewitt, D. F., thurman, J. D., Warbritton, A., Wolff, G. L. 1997.** Genome-linked toxic responses to dietary iron overload. Toxicol. Pathol. 25: 556-564.
- Whittaker, P.G., Hines, F., Robi, M.G., Dunkel, V.C., 1996.** Histopathological evaluation of liver, pancreas, spleen, and heart from iron-overloaded Sprague-Dawley rats. Toxicologic Pathology 24: 558-563.
- Whittaker, P.G., Mahoney, A.W., Hendricks, D.G. 1984.** Effect of iron-deficiency anemia on percent blood volume in growing rats. J. Nutr. 114: 1137-1142.
- WHO (World Health Organisation). 1998.** Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge. Geneva.
- WHO. 2002.** Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva (WHA/NHD/01.03).
- WHO. 2004.** On Food Fortification with Micronutrients for the Control of Micronutrient Malnutrition. Geneva: World Health Organization.
- WHO/UNICEF/UNU. 2001.** Iron Deficiency Anaemia, Assessment, Prevention, and Control. WHO, Geneva.
- Wickramasinghe, S.N. 2006.** Diagnosis of megaloblastic anemias. Blood Reviews. 20: 299-318.
- Widicius, A.W., Kirk, J.R. 1981.** Storage stability of alpha-tocopherol in a dehydrated model system containing methyl linoleate. J. Food Sci. 46: 813.
- Wienk, K.J.H., Marx, J.J.M., Beynen, A.C. 1999.** The concept of iron bioavailability and its assessment. Eur. J. Nutr. 38: 51-75.
- Williams, W.M., Huang, K.C. 1982.** Renal tubular transport of folic acid and methotrexate in the monkey. Am J. Physiol; 242: F484-F490.
- Wood, R.J., Han, O., 1998.** Recently identified molecular aspects of intestinal iron absorption. J. Nutr. 128, 1841-1844.
- Woollard, D.C., Fairweather, J.P. 1985.** The storage stability of vitamin A in fortified ultra-high temperature processed milk. J. Micronutr. Anal. 1: 13-21.
- WHO. 1986.** Thirty-Ninth World Health Assembly. Guidelines concerning the main health and socioeconomic circumstances in which infants have to be fed on breast-milk substitutes. A39/8 Add. 1. 10 April 1986.
- WHO. 1999.** International Programme on Chemical Safety. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Fifty-third meeting, Rome, 1-10 June 1999. Additives and Contaminants.
- World Health Organization. 2000.** ACC/SCN fourth report on the world nutrition situation. Geneva.
- World Health Organization. 2006.** Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva
- Worthington, M. T., Cohn, S. M., Miller, S. K., Luo, R. Q., Berg, C. L. 2001.** Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 280: G1172-G1177.
- Wu, A., Chanarin, I., Slavin, G., Levi, A.J. 1975.** Folate deficiency in the alcoholic-its relationship to clinical and haematological abnormalities, liver

disease and folate stores. Br. J. Haematol. 29: 469-178.

Wyllie, J. C., Kaufman, N. 1982. An electron microscopic study of heme uptake by rat duodenum. Lab. Invest. 47: 471-476.

Yip, R., Dallmann, P. R. 1988. The roles of inflammation and iron deficiency as causes of anemia. Am. J. Clin. Nutr. 48(5):1295-300.

Zafra-Gómez, A., Garballo, A., Morales, J., García-Ayuso, L. 2006. Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 54: 4531-4536.

Zhang, D., Hendricks, D.G., Mahoney, A.W. 1989. Bioavailability of total iron from meat, spinach (*Spinacea oleracea L.*) and meat-spinach mixture by anemic and non-anemic rats. Br. J. Nutr. 61. 331-343.

Zimmermann, M.B., Hurrell, R.F. 2007. Nutritional iron deficiency. Lancet. 370: 511-520.

Zimmermann, M.B., Wegmueller, R., Zeder, C y col. 2004. Dual fortification of salt with iodine and micronised ferric pyrophosphate: a randomized, double blind, controlled trial. Am. J. Clin. Nutr. 80: 952-959

Zimmermann, M.B., Winichagoon, P., Gowachirapant y col. 2005. Comparison of the efficacy of wheat-based snacks fortified with ferrous sulphate, electrolytic iron, or hydrogen-reduced elemental iron: randomized, double-blind, controlled trial in Thai women. Am. J. Clin. Nutr. 82: 1276-1282.

Zimmermann, M.B., Winichagoon, P. y col. 2005. Comparison of efficacy of wheat-based snacks fortified with ferrous sulfate, electrolytic iron, or hydrogen-reduced elemental iron: randomized, double-blind, controlled trial in Thai women. Am. J. Clin. Nutr. 82: 1276-1282.