

**BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO PRESENTE  
EN MUESTRAS DE MAIZ CRUDO, MASA  
NIXTAMALIZADA Y TORTILLAS**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica

**BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO PRESENTE  
EN MUESTRAS DE MAIZ CRUDO, MASA  
NIXTAMALIZADA  
Y TORTILLAS**


PABLO CESAR CONTRERAS SIERRA

Trabajo de graduación presentado para optar  
al grado académico de licenciado en Bioquímica.

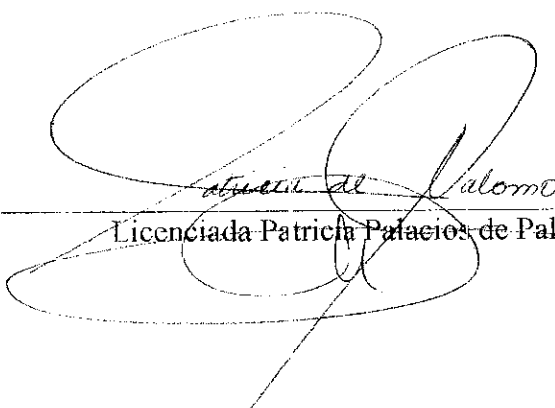
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Guatemala


1999

Vo. Bo. :

(f)   
Dr. Ricardo Bressani  
Asesor

Tribunal:

(f)   
Licenciada Patricia Palacios de Palomo

(f)   
Licenciada Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f)   
Dr. Ricardo Bressani

Fecha de aprobación: 16 de julio de 1999.

**A Dios y a mi querida familia:  
Julio, Dinah y Julio Ernesto.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ricardo Bressani, Licda. Patricia de Palomo, Licda. Ana Silvia de Colmenares, Víctor Chajón y Clara Luz de Pereda, por toda la colaboración en la realización del presente proyecto de investigación.

## INDICE DE CONTENIDOS

	página
RESUMEN	
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES TEORICOS	2
A. Aspectos relacionados con el maíz, su consumo y procesamiento	2
1. El maíz en la dieta del guatemalteco	2
2. Fortificación de la dieta del guatemalteco	2
3. La producción de harinas de maíz y los cambios globales que representa	3
B. Metabolismo del hierro	4
1. Función y distribución del hierro organismal	4
2. Absorción del hierro en el tracto gastro-intestinal y factores que la afectan	5
3. Metabolismo del hierro	7
C. Algunos estudios como antecedentes del presente proyecto	8
III. OBJETIVOS	9
A. Objetivos generales	9
B. Objetivos específicos	9
IV. HIPOTESIS DEL ESTUDIO	10
V. MATERIALES Y METODOS	11
A. Metodología utilizada	11
1. Procesamiento del maíz hasta la fabricación de tortillas	11
2. Mezcla de dietas experimentales	11

	página
3. Ensayos IN VIVO con ratas	12
a. Proceso de depleción de los grupos experimentales que usan una dieta basal baja en hierro	12
b. Proceso de repleción de los grupos experimentales con dietas de maíz crudo, masa y tortillas, además de dietas con sulfato ferroso	13
4. Ensayos IN VITRO	14
a. Determinación del ácido fítico	
b. Determinación del hierro total	15
c. Determinación del hierro ionizable	16
5. Análisis de hierro hepático en las ratas del ensayo IN VIVO	17
B. Materiales y reactivos utilizados	17
1. Preparación y mezcla de las dietas experimentales	17
2. Ensayo IN VIVO	18
3. Ensayo IN VITRO	18
4. Análisis de hierro hepático de las ratas	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	21
A. Contenido de ácido fítico, hierro total y hierro ionizable en maíz crudo, masa y tortilla	23
B. Depleción de hemoglobina en los animales	26
C. Repleción de hemoglobina en los animales	27
D. Relación entre los ensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	36
E. Resultados sobre los niveles de hierro en los hígados de las ratas utilizadas en el ensayo <i>in vivo</i>	37
F. Gráficas de los resultados	42
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. RECOMENDACIONES	53
IX. LITERATURA CITADA (BIBLIOGRAFIA)	56

	página
X. APENDICES	58
A. Datos sobre peso de las ratas que iniciaron el ensayo biológico IN VIVO	58
B. Muestreo de sangre realizados durante la etapa de depleción	61
C. Base de datos sobre parámetros medidos a los animales del experimento	64
D. Valores individuales del índice HRE, Índice 2 e Índice 3	66
E. Base de datos sobre los valores de Acido Fóico, Hierro Total y Hierro Ionizable	68
F. Base de datos sobre los valores de hierro hepático de las 40 ratas disectadas	70
G. Análisis estadístico realizado para diferencia de medias del índice de Eficiencia de Regeneración de Hemoglobina	72

## LISTA DE TABLAS Y GRAFICAS

Tabla	página	
4.1	Ingredientes utilizados en la preparación de las dietas	22
4.2	Contenido de las dietas de la curva de calibración	22
4.3	Resultados de ácido fítico de las muestras	23
4.4	Resultados de hierro total de las muestras	23
4.5	Resultados de hierro ionizable	24
4.6	% de hierro disponible en las muestras	24
4.7	Dieta basal baja en hierro	26
4.8	Parámetros medidos en las ratas que entraron al ensayo	28
4.9	Parámetros calculados a partir de la tabla 4.8	29
4.10	Parámetros medidos en las ratas de la curva de calibración	30
4.11	Parámetros calculados a partir de la tabla 4.10	31
4.12	Regresión lineal entre S. Ferroso y hierro ganado	32
4.13	Valores calculados de sulfato ferroso relativo	32
4.14	Índice de biodisponibilidad HRE	34
4.15	Índice de hierro biodisponible para regeneración de Hb	35
4.16	Valor Biológico Relativo e índice de hierro disponible	36
4.17	Niveles de hierro hepático	38
Gráficas		página
4.1	Comportamiento del ácido fítico	42
4.2	Comportamiento del hierro total	43
4.3	Comportamiento del hierro ionizable	44
4.4	% de hierro ionizable in vitro de las muestras	45
4.5	Índice de Rao y Prabhavathi	46
4.6	Eficiencia de regeneración de hemoglobina	47
4.7	Hierro disponible para regeneración de hemoglobina	48
4.8	Hierro disponible para uso biológico in vivo	49
4.9	Comparación entre índices de disponibilidad del hierro in vivo, in vitro y Rao y Prabhavathi	50

## RESUMEN

La biodisponibilidad del hierro en el maíz es baja y se cree que esto se debe principalmente a factores internos quelantes del hierro tales como el ácido fítico y la fibra dietética. El informe que se presenta a continuación detalla la realización del proyecto que consistió en la medición de la biodisponibilidad del hierro en muestras de maíz crudo, masa de maíz nixtamalizado y tortillas.

Primeramente se prepararon las muestras de maíz para lo cual se utilizó el criterio de que un mayor tiempo de cocción, concentración de cal mayor, así como un mayor tiempo de remojo del grano durante el proceso de nixtamalización incide directamente en la disminución del nivel del ácido fítico. Con estas muestras se mezclaron, junto con otros ingredientes, las dietas experimentales a ser probadas con ratas anémicas, siendo éste el ensayo biológico *in vivo* del procedimiento. Se utilizó sulfato ferroso como estándar de comparación del hierro ionizable. Con los resultados obtenidos se calculó el índice de Eficiencia de Regeneración de Hemoglobina, el índice de Hierro Disponible, y el índice de disponibilidad del hierro en base al valor biológico relativo.

Posteriormente se realizó una batería de ensayos *in vitro* como comparación de los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*. Los ensayos realizados en esta fase fueron la medición de los niveles de ácido fítico, hierro total y hierro ionizable en las tres muestras de maíz (crudo, masa y tortilla). Con dichos resultados fue posible calcular también un índice de biodisponibilidad teórica del hierro en cada estado del maíz.

Los resultados obtenidos mostraron, tanto *in vivo* como *in vitro*, que aunque fue posible disminuir el nivel del ácido fítico por medio del proceso de cocción húmeda propuesta, la biodisponibilidad del hierro en ambos casos disminuyó de maíz crudo a masa y de masa a tortilla, contrario a lo propuesto en las hipótesis del estudio. Debido a varios factores no contemplados en la metodología, tales como la contaminación de hierro con fuentes externas, etc., los resultados obtenidos no son suficientes para concluir en una afirmación o negación de las hipótesis planteadas, más dichos resultados se utilizaron para formular una serie de recomendaciones para estudios posteriores en dicha materia.

## I. INTRODUCCIÓN

Debido a que el consumo de maíz y harinas de maíz nixtamalizadas en Guatemala es grande, se consideran éstas últimas como un buen vehículo para mejorar la calidad de la dieta de los guatemaltecos. El maíz posee compuestos como el ácido fítico y fibra dietética, los cuales disminuyen la biodisponibilidad de algunos elementos como el hierro y el zinc; es de esta cuenta que se piensa que no habrá tanto problema para la fortificación con vitaminas del complejo B y sí con hierro y zinc.

Dentro de la planificación para un gran proyecto que pueda llegar a establecer las bases de la fortificación con hierro de harinas de maíz producidas industrialmente, es necesario realizar una serie de proyectos a menor escala, los cuales aportarán información útil para dicha planificación. Este es el caso del presente plan de investigación, donde se busca obtener información referente a la biodisponibilidad del hierro en el maíz, y cómo dicha biodisponibilidad puede cambiar a lo largo del procesamiento del maíz crudo, pasando por masa hasta llegar a tortilla.

Sabiendo que existen factores como el ácido fítico que hacen al hierro del maíz poco disponible, es necesario estudiar cómo la disminución de este ácido fítico por medio de la cocción húmeda o nixtamalización puede aumentar directamente la biodisponibilidad del hierro. Para tal efecto deben realizarse diferentes ensayos que provean dicha información, tales como ensayos biológicos *in vivo* por medio de los cuales se estudiará el comportamiento del organismo frente a la ingesta de dichas muestras; deben realizarse también ensayos *in vitro* que puedan respaldar los primeros y tener un punto de comparación.

Proyectos como éste aportarán información útil que podrá tomarse como herramienta para la elaboración de un plan de fortificación, ya que esta información incluso determinará si es o no el maíz en forma de harina el mejor producto para llevar a cabo dicha fortificación.

## **II. ANTECEDENTES**

### **A. Aspectos relacionados al maíz, su consumo y procesamiento**

#### **1. El maíz en la dieta del guatemalteco**

En la dieta del guatemalteco se presenta el maíz como uno de los alimentos de mayor consumo; la mayoría de la población tiene acceso a productos de maíz, principalmente las tortillas. Según el Instituto Nacional de Estadística (1991), el maíz es el cereal más consumido en Guatemala, ya que se consume en un 64.4% en el área urbana y un 85.3% en el área rural. De estos porcentajes se desprenden datos como que el consumo promedio en granos diarios por persona es de 454 en el área rural y 251 en el área urbana. Según el INCAP (1969), el maíz aporta cantidades altas de proteína y calorías a la dieta del guatemalteco.

Debido a la demanda de productos de maíz en Guatemala, comúnmente el consumidor obtenía los productos derivados de éste como las tortillas, tamales, etc., luego de realizar el proceso de nixtamalización del grano crudo. Este proceso requiere una inversión extra de agua y energía, esto según Bressani et al, (1972). Las harinas nixtamalizadas de maíz han constituido en los últimos años una nueva opción para los guatemaltecos. De esta cuenta se conocen en la actualidad más de cuatro marcas (entre nacionales y extranjeras) de harinas para la preparación de masa en el mercado urbano y rural.

#### **2. Fortificación de la dieta del guatemalteco**

Debido a que la dieta del guatemalteco presenta una deficiencia marcada en algunos nutrientes como vitamina A, hierro, yodo, etc., se han buscado las formas adecuadas para hacer llegar a la población productos fortificados con estos nutrientes; de ahí que productos como el azúcar es fortificada con vitamina A, la sal con yodo, y se

espera poder fortificar las harinas de maíz con nutrientes como hierro y vitaminas del complejo B. No se esperan problemas para la fortificación con vitaminas del complejo B, pero puede que existan problemas para la fortificación con hierro.

Según Martínez-Torres et al, (1987) de los cereales más consumidos en general, el maíz presenta la menor biodisponibilidad de hierro. Según Reinhold et al (1981) y Reinhold y García (1979) los principales factores que interfieren con la baja biodisponibilidad del hierro en el maíz son el ácido fítico y la fibra dietética. El ácido fítico presenta una alta afinidad para atrapar el hierro y otros elementos como el Zn. La fibra dietética tiene también la capacidad de ligar el hierro. Sumado a la presencia de estos factores es muy importante tomar en cuenta el hecho de que el contenido de hierro en el maíz es bajo. Es muy poca la información disponible al respecto de los niveles de hierro en los productos de maíz como las harinas industriales, además que existe muy poca información sobre el comportamiento del ácido fítico frente al proceso de nixtamalización y producción de tortillas.

### **3. La producción de harinas de maíz y los cambios globales que representa**

Según Bressani, (1990) el proceso de nixtamalización, ya descrito por otros autores, conlleva a una serie de cambios físicos, químicos y nutricionales en el maíz. El proceso de nixtamalización consiste básicamente en la cocción húmeda del grano de maíz con cal, seguida por un remojo del maíz para luego lavarlo con agua. El proceso de cocción involucra la utilización del maíz, agua y cal (esta última en concentraciones cercanas a 1.2% de cal/peso de maíz), demorando un tiempo de cocción de unos 40 a 75 minutos. El remojo tarda alrededor de 12 horas. El producto del proceso indicado se conoce como nixtamal, del cual luego de la molienda se obtiene masa para utilizarse en diferentes productos como las tortillas. La tortilla se obtiene al cocinar la masa en una plancha a temperaturas entre 180 y 220 grados celcius. De acuerdo con Bressani, (1990) la última parte del proceso de producción de harinas la constituye la deshidratación de la masa con aire caliente.

Según Paredes-Lopez y Saharoupulos, (1982) dentro de las estructuras del maíz se produce un cambio en los gránulos de almidón así como la estructura física de las proteínas, además que aumenta la formación de masa y la viscosidad. Con respecto al contenido de nutrientes, Bressani et al (1958) no reportan cambios considerables a nivel de macronutrientes como fibra, grasa, proteína y carbohidratos, aunque sí existen pérdidas de vitaminas del complejo B y que el calcio aumenta considerablemente y el hierro no tiene un patrón ya definido.

Los trabajos de investigación que se han realizado respecto del maíz y el proceso de nixtamalización han sido poco dirigidos a otros compuestos que interfieren con micronutrientes como el hierro, pero se cree que son el ácido fítico y la fibra dietética las que ligan de cierta forma al hierro y lo hacen poco biodisponible. Sin embargo la literatura disponible al respecto del comportamiento del ácido fítico en el maíz durante el proceso de nixtamalización es muy poca. La poca información disponible obtenida directamente de las fuentes (Bressani, 1998) apuntan al hecho de que una adecuación del proceso de nixtamalización podría reducir el nivel de ácido fítico en el nixtamal y que ésta podría llevar a un aumento en la disponibilidad biológica del hierro en dichas masas o harinas de maíz, lo cual se investiga en este trabajo.

## **B. Metabolismo del hierro**

### **1. Función y distribución del hierro organismal**

El rol principal del hierro en el organismo es en los procesos de respiración celular, ya que en su mayoría el hierro es el componente principal de la hemoglobina, mioglobina, citocromos, además de formar parte estructural de otras enzimas como la catalasa y la peroxidasa. Se debe recordar que en estructuras como la hemoglobina se habla de una proteína en cuyo centro se encuentra alojado el hierro, y que ésta es la forma más común de su transporte y almacenamiento en el cuerpo, ligada a una proteína.

(Harper, 1975) En la producción del compuesto hemo, se tiene como paso final de una serie de uniones proteicas y enzimáticas, la quelación del hierro por una protoporfirina; dicho hemo se unirá posteriormente a una proteína globular para completar la hemoglobina (Kaplan & Pesce, 1984). En el siguiente cuadro se muestra una distribución aproximada del hierro en los diferentes compartimientos organismales (según Harper, 1975):

#### **Distribución orgánica del hierro en los humanos**

<b>Compuesto</b>	<b>% del hierro total</b>
Hemoglobina	60-70
Mioglobina	3-5
Enzimas como catalasas y citocromos c	0.2
Transferrinas y ferritinas	15
Almacenamiento en hígado, bazo y médula ósea	Aprox. 10

Según Harper (1975), alrededor de un diez por ciento del hierro orgánico está guardado en algunos compartimientos de reserva tales como el hígado, el bazo y la médula ósea; sin embargo se cree que la mayor concentración puede estar en el bazo y médula ósea por ser estos órganos responsables del ensamble y liberación de células sanguíneas como las células rojas, y debido a que se lleva a cabo la síntesis del pigmento hemo, es necesario el hierro. En el hígado el hierro es almacenado en forma de hemosiderina, que en asociación con una proteína forman un óxido de hierro coloidal que puede ser observable al microscopio (Harper, 1975)

## **2. Absorción del hierro en el tracto gastrointestinal y factores que le afectan**

La absorción del hierro por el organismo es un proceso que debe ser bien regulado por el tracto gastrointestinal, ya que los excesos de hierro que llegan al organismo se

acumulan en su mayoría en los tejidos llegando a ser tóxicos en algunos casos, y una mínima cantidad se excreta por la orina. (Harper, 1975)

El ácido estomacal (ácido clorhídrico) es el encargado de ionizar las formas de hierro que ingresan al organismo a través de los alimentos, los cuales en su mayoría ingresan en estado férrico o como compuestos orgánicos férricos. Este rompimiento del hierro en iones libres hace que su absorción sea mucho más fácil y rápida. La absorción del hierro ocurre principalmente en las paredes del estómago y del duodeno (primera porción del intestino delgado), y se cree que las apoferritinas que existen en la pared mucosa que recubre el intestino funciona como control de la absorción activa del hierro. (Harper, 1975)

En este punto es importante mencionar que la absorción del hierro puede verse afectada por varios factores como los siguientes: a) pacientes que han sufrido de una intervención quirúrgica y han perdido parte del estómago o intestino, b) la presencia de tumores invasivos en las paredes del estómago y duodeno, c) síndromes como la esteatorrea disminuyen también dicha absorción, d) dietas altas en fosfatos ya que los compuestos formados de fosfatos y hierro son insolubles y por ende no absorbidos, mientras que las dietas bajas en fosfatos tienden a hacer mayor la absorción del hierro, e) compuestos como el ácido fítico de los cereales y los oxalatos también son factores que afectan dicha absorción ya que se cree que estos factores quelan al hierro y lo hacen poco disponible. (Harper, 1975)

La ingesta de hierro recomendada para las diferentes edades y sexos depende mucho de los requerimientos orgánicos de hierro, pero en general la ingesta recomendada está entre los 10 y 18 mg diarios. De igual forma los niveles de algunos compuestos como la hemoglobina varían dependiendo del sexo y la edad, encontrándose los valores de hemoglobina normales entre 12 y 18 gramos por decilitro de sangre (Merck, 1998)

### 3. Metabolismo del hierro

La forma más común de almacenamiento del hierro es la ferritina, que es la forma en la que es absorbido en el intestino y estómago; pero esta ferritina no se encuentra sólo en dichos órganos sino también en el hígado, bazo y médula ósea. Si la administración del hierro por la vía parenteral (por venas y arterias) excede los valores normales, el hierro se almacena en el hígado en la forma coloidal que se mencionó anteriormente, la hemosiderina. (Harper, 1975)

Los niveles de hierro en el organismo están regulados de diversas maneras, y esto responde a un equilibrio bastante complicado, donde el anabolismo y catabolismo de moléculas que contienen hierro como la hemoglobina, citocromos c, mioglobina, etc., juegan un rol importante. Se debe considerar que la importancia del hierro no estriba sólo en el hecho de formar parte de las moléculas que tienen a su cargo proveer de oxígeno al organismo y la respiración celular, sino también mantener la integridad celular; según Harper, (1975), estudios conducidos con ratas demostraron que la disminución de compuestos como los citocromos c son los implicados directamente en la producción de síntomas en los procesos de anemias hipocrómicas, por lo que ocurre una producción de síntomas aun que los niveles de hemoglobina en sangre sean normales.

Otros estudios del metabolismo del hierro sugieren que por no existir un patrón eficiente para la excreción del hierro excedente, algunos síndromes por acumulación de hierro tales como la hemocromatosis son comunes; culturalmente también se han tenido informes que presentan que grupos indígenas que basan su dieta en cereales y productos bajos en fosfatos presentan hemocromatosis también (Harper, 1975).

Estudios realizados por Benito, House y Miller en 1997, sobre la influencia que tiene la frecuencia de alimentación en la absorción de hierro sugieren que diariamente una ingesta repartida en varias porciones resulta en una mejor absorción de hierro que si se realiza en una sola ingesta.

### **C. Algunos estudios antecedentes al presente proyecto**

En 1978, Narasinga Rao y T. Prabhavathi propusieron un método para la predicción de la biodisponibilidad del hierro no hemínico o ionizable de los alimentos; el método consiste en una extracción del hierro por medio de una digestión con pepsina en medio ácido de 1.35 y posteriormente ajustado el pH a 7.5. Los autores sugieren que el hierro ionizable de los alimentos y dietas determinadas a este pH pueden usarse como buenos predictores de la biodisponibilidad del hierro, siendo demostrado por la alta correlación existente entre dichos valores obtenidos y los valores reportados para la absorción de hierro en hombres adultos.

En 1985, García Lopez y Lee propusieron que otros minerales como el cobre y el zinc compiten con el hierro por los lugares de ligamiento con la fibra dietética.

En 1977, J. Miller estudió la biodisponibilidad del hierro en diferentes productos de panadería por regeneración de hemoglobina en ratas anémicas; en este estudio Miller utilizó sulfato ferroso como estándar, y encontró que los valores biológicos relativos de biodisponibilidad del hierro en dichos productos era similar a los valores obtenidos con el sulfato ferroso.

En 1972, Amine, Neff y Hegsted estudiaron la estimación biológica del hierro disponible utilizando ratas y pollos. En este estudio los autores proponen que la determinación del hierro por medio de hemoglobina y hematocrito fue más satisfactoria que la presentada por el cálculo por medio del peso corporal.

Estudios realizados por Ikon en 1981 sugieren que alrededor del 37.5% del hierro ingerido en ratas es utilizado para la regeneración de hemoglobina, mientras que Zhang et al en 1985 sugirieron que dicho porcentaje era de 39%.

### **III. OBJETIVOS**

#### **A. OBJETIVOS GENERALES:**

1. Contribuir a la obtención de información sobre la biodisponibilidad del hierro del maíz, para su utilización en futuros estudios de fortificación de harinas de maíz con hierro y otros micronutrientes.

#### **B. OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1. Evaluar el efecto que tiene la transformación de maíz crudo a nixtamal-masa sobre el contenido de ácido fítico, hierro total y hierro ionizable en dicha masa.
2. Determinar el efecto que tiene, la cocción de la masa en la fabricación de tortillas, sobre el contenido del ácido fítico, hierro total y hierro ionizable (a pH 7).
3. Evaluar la biodisponibilidad del hierro proveniente del maíz crudo, de la masa y de la tortilla, utilizando ratas para el ensayo biológico *in vivo*.
4. Utilizar metodologías analíticas para obtener la disponibilidad *in vitro* del hierro de las muestras de maíz crudo, masa y tortilla.
5. Determinar si existe evidencia estadística como para validar o invalidar las hipótesis planteadas para el estudio.

#### **IV. HIPOTESIS DEL ESTUDIO**

Los procedimientos necesarios para la obtención de resultados útiles durante la realización de este proyecto son básicamente el procesamiento de las diferentes muestras de maíz por medio de nixtamalización y cocción de tortillas con las condiciones propuestas, enfocado básicamente a la disminución del ácido fítico en la masa y las tortillas. Posteriormente debe evaluarse por medio de un ensayo *in vivo* y uno *in vitro*, la biodisponibilidad del hierro en las tres muestras, para obtener evidencia que sustente las siguientes hipótesis:

**“ La optimización del proceso de nixtamalización del maíz, al aumentar la concentración de cal e incremento del tiempo de cocción, tienen como resultado la reducción sustancial del nivel de ácido fítico. Como consecuencia de esta reducción del nivel del ácido fítico, la cantidad de hierro biodisponible en la masa aumenta.”**

Un segundo planteamiento es:

**“ Se espera que el proceso de transformación de masa a tortilla no produzca cambios sustanciales en los niveles de ácido fítico y hierro biodisponible.”**

## **V. MATERIALES Y METODOS**

### **A. Metodología usada**

#### **1. Procesamiento del maíz hasta la fabricación de tortillas**

- Obtención de las muestras de maíz crudo (maíz de la variedad HB83)
- Caracterización de las muestras de maíz: medición de los niveles de ácido fítico, hierro total y ionizable.
- Transformación del maíz crudo a harina nixtamalizada, siguiendo los siguientes procesos:
  - Colocar 1000g de maíz crudo junto con 4000cc de agua y 12 g de cal
  - Realizar una cocción de 75 minutos
  - Remojar a una temperatura de 50 grados C por 10 horas, realizando en este proceso una agitación lenta.
  - Lavar el maíz ya cocido y remojado con agua a pH menor de 7.
  - Pasar las muestras por un molino de Nixtamal.
  - Secar la muestra y luego molerla para fabricar harina y poder almacenarla así.
  - Determinación química de niveles de ácido fítico, hierro total y ionizable.
- Paso de transformación de las harinas del paso 3 a tortilla, siguiendo los siguientes pasos:
  - Hacer tortillas a partir de 1000g de harina del paso anterior.
  - Deshidratar y moler las tortillas para fabricar harina de tortilla.
  - Determinación química de niveles de ácido fítico, de hierro total y ionizable.

#### **2. Mezcla de las dietas experimentales**

Se almacenan 2.5 Kg de cada muestra de harina para su utilización en la mezcla de las dietas experimentales. En la sección de resultados se presentan las tablas finales de la composición tanto de las dietas con maíz crudo, masa y tortilla, como las dietas con sulfato ferroso para la curva de calibración. (tablas #1 y #2). Para la mezcla

de las dietas experimentales con maíz, masa y tortilla, todos los ingredientes se mezclaron en un recipiente plástico y fueron reinnovados con la mano por término de 15 minutos hasta lograr una harina homogénea. Para las dietas con sulfato ferroso, por ser sólo unos cuantos miligramos los utilizados, se fue diluyendo dicho sulfato con almidón hasta tener una mezcla homogénea de almidón con sulfato y se mezcló el resto de los ingredientes hasta tener la harina mezclada y removida por quince minutos.

El almacenamiento de las dietas experimentales se hizo en cuarto frío a 4°C y guardadas en bolsas plásticas individuales.

### 3. Ensayos IN VIVO

#### **Evaluación biológica propuesta; modificación del método de la AOAC 947.31 (versión de 1995) para la medición de hierro biodisponible por repleción de Hb en ratas**

##### **a. Proceso de depleción de los grupos experimentales de ratas utilizando dieta basal baja en hierro**

Este proceso se inició con ratas de 23 a 25 días de nacidas. Ratas blancas de laboratorio de raza Whinstar, y dichas ratas tenían valores de hemoglobina inicial de 12 a 14 g/dL de sangre. La dieta basal que se utilizó para la depleción tuvo la siguiente formulación:

#### **Dieta basal baja en hierro**

<b>Componente</b>	<b>g/Kg</b>
Caseína	141
L-Metionina	2
Mezcla vitamínica *	22
Mezcla mineral (no Fe)*	35
Aceite vegetal	50
Almidón de maíz	750

*\* Para este caso se utilizaron mezclas vitamínicas y minerales ya preparadas comercialmente, las cuales estuvieron libres de hierro.*

Se le administró de 20 a 25 gramos de dieta basal a cada animal por el término de las doce semanas. Las ratas tenían agua destilada desionizada *ad libitum*. Cada rata estaba en una jaula individual, de acero inoxidable, con bebederos de cobre y acero inoxidable y comederos de vidrio. Se registró el peso de los animales semanalmente hasta el inicio de la fase de repleción. Durante el proceso de depleción se realizaron evaluaciones de la hemoglobina del grupo total basado en muestras de alrededor del 25% de los especímenes. Estos muestreos se realizaron cada dos semanas. La depleción se realizó por 12 semanas aproximadamente, hasta que los valores de hemoglobina de las ratas estuvieron entre 7g y 12 gramos por 100mL de sangre.

Todos los análisis de sangre para la medición de hemoglobina se realizaron rutinariamente con un Kit colorimétrico de determinación (Merckotest 1.03317.0001) con su respectivo Kit de calibración con estándares de cianohemoglobina (Merck 1.03298.0001).

**b. Proceso de repleción de los grupos experimentales: dietas con maíz crudo, masa y tortillas, dietas con sulfato ferroso**

Para el proceso de repleción fueron escogidas 40 ratas de todas las depletadas (85 en total), las cuales tenían los valores de hemoglobina más bajos de todas. Se establecieron 10 grupos experimentales con valores de hemoglobina promedio similar, cada grupo compuesto de 4 ratas (2 machos y 2 hembras), y se distribuyeron de la siguiente forma:

- 4 grupos de ratas se repletaron con sulfato ferroso a concentraciones de 0, 5, 10 y 15 mg Fe/Kg de dieta.
- 2 grupos de ratas se repletaron con dietas al 62.5% y 75% de harina de maíz crudo.
- 2 grupos de ratas se repletaron con dietas al 62.5% y 75% de harina de maíz nixtamalizado (masa).

- 2 grupos de ratas se repletaron con dietas al 62.5% y 75% de harina de tortillas.

A cada rata se le proporcionó de 10 a 20 gramos de alimento diario (todo medido) hasta completar luego de 12 días de repleción un total de 205 gramos de dieta. Al inicio del ensayo de repleción se midieron tanto el valor de hemoglobina inicial como el peso, y de igual forma se hizo al final, para determinar aumento en ambas escalas. Básicamente el cuidado individual de cada animal fue como el llevado en el proceso de depleción.

#### **4. Ensayos IN VITRO**

##### **a. Determinación de ácido fítico en las muestras de harina de maíz crudo, masa y tortillas**

Los pasos seguidos para dicha determinación se obtuvieron de la referencia: **Sensitive method for rapid determination of phytate in cereals and cereal products, J. Sci. Food Agric. 1983, 34, 1423-1426.**

- Se realizó una extracción de la planta o de la harina con HCl 0.2N por una hora.
- Se tomaron 0.5 mL de dicho extracto y se le agregó 1 mL de una solución férrica compuesta de sulfato de hierro (III) y amonio en HCl 0.2N, todo en un tubo de ensayo y se calentó en un baño María por 30 minutos.
- Se enfrió la solución anterior por 15 minutos en agua con hielo y luego se dejó a temperatura ambiente.
- (Se siguió la variante b del método) Ya a temperatura ambiente, se agregó a cada tubo de ensayo 2 mL de una solución de 2,2'-Bipiridina. Inmediatamente (y antes de 1 minuto de agregada dicha solución) debe leerse la absorbancia a 519 nm.

- Todas las muestras se analizaron en duplicado.
- Se realiza una curva de calibración con ácido fítico con puntos entre 0 hasta 32 microgramos de fitatos por mililitro de solución, utilizando el mismo método que las muestras. Dicha curva de calibración tuvo un r de correlación de -0.9982.

**b. Determinación de hierro total en muestras de harina de maíz crudo, masa y tortillas**

- Se colocaron 2 gramos de cada muestra, trabajando en duplicado, en un crisol, y se calentó en estufa alrededor de una hora hasta quemar la muestra.
- Luego se llevaron dichos crisoles a la mufla y se calentaron por dos horas a 500 grados centígrados hasta incinerar la muestra.
- Después de enfriadas las muestras, se les agregó 3 mL de ácido nítrico (1+1: igual proporción de ácido nítrico concentrado y agua destilada) y 5 gotas de agua. Se evaporó todo el ácido en estufa y campana. Este proceso sirve para blanquear las cenizas producidas en el paso anterior.
- De nuevo se llevaron las muestras a la mufla por una hora más a 500 grados centígrados.
- Las cenizas blancas remanentes en el crisol se lavan con 10 mL de ácido clorhídrico (1+1, igual que el nítrico), y luego este volumen se completa hasta llegar a 25 mL con agua destilada desionizada.
- Se realiza un filtrado de la solución final (filtración por gravedad) y se leen las muestras en un aparato de absorción atómica con lámpara multielemento en la longitud de onda de absorción del hierro.
- Se realiza una curva de calibración con estándares de hierro entre 0 ppm y 5 ppm de hierro.

**c. Determinación de hierro ionizable en muestras de harina de maíz crudo, masa y tortillas**

Los pasos seguidos para dicha determinación son una adaptación del método de **Narasing Rao & Prabhate, 1978**.

- Se pesaron 2.0000 gramos de cada harina, y se realizaron triplicados para cada muestra.
- Se incubó cada muestra con 25 mL de una solución de Pepsina-HCl, que consiste en una solución de Pepsina al 0.5% en HCl 0.1N.
- Se ajustó el pH de la mezcla a 1.35 con HCl para activar la enzima, y se incubó por 90 minutos en un baño térmico a 37°C por 90 minutos.
- Se centrifugó la mezcla por 45 minutos a 3000 rpm.
- Se filtró el sobrenadante a través de papel filtro No. 44 usando vacío.
- Se ajustó el pH de la mezcla a 7.5 con NaOH y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm y se filtró el sobrenadante de nuevo.
- Dicho sobrenadante se agregó en un balón de aforar con agua destilada-desionizada hasta llegar a 25 mL.
- De este frasco se tomaron 10 mL y se colocaron en otro balón de aforar junto con 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina, unos minutos después se agregó 5 mL de una solución buffer de acetatos y 1 mL de una solución de o-fenantrolina (solución de alfa,alfa-dipiridilo), y se llevó a 25 mL con agua destilada desionizada.
- Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a 510 nm; el cero de absorbancia se colocó con un blanco de los reactivos. Se leyeron también las absorbancias de la muestra como tal, antes del paso anterior, para realizar una corrección por ser la muestra coloreada.

- Para la determinación de los valores se utilizó una curva de calibración con estándares de hierro desde 0 ppm de hierro hasta 0.5 ppm de hierro, donde se obtuvo un r de correlación entre ppm de hierro vs. absorbancia de 0.9986.

### **5. Análisis de hierro hepático en las ratas del ensayo in vivo**

Luego de terminado el ensayo biológico in vivo con las 10 dietas experimentales, se disectaron dichos especímenes y se extrajo el hígado completo (los cuatro lóbulos intactos), se determinó entonces el peso fresco total del hígado. De cada hígado extraído se realizó, en duplicado, una determinación de hierro total por análisis de cenizas, tal y como se analizaron las muestras de harinas en el punto 2 de los análisis in vitro. La única variante fue que se utilizó únicamente 1 gramo de muestra por análisis. La obtención de los valores de hierro hepático se realizó de la misma forma que en las harinas.

## **B. Materiales y reactivos utilizados**

### **1. Preparación y mezcla de las dietas experimentales**

#### REACTIVOS

- Maíz de la variedad HB83
- Carbonato de calcio (cal) de grado analítico
- Agua destilada-desionizada
- Caseína
- L-Metionina grado analítico marca Merck
- Mezcla vitamínica completa marca Dyets
- Mezcla mineral completa libre de hierro marca Dyets
- Sulfato Ferroso cristalino hepta hidratado marca J.T. Baker
- Aceite vegetal

- Almidón de maíz
- Harinas de maíz crudo, masa y tortillas

#### EQUIPO

- 4 beakers pyrex de 3000 mL
- 4 estufas hot plate/stirrer marca Corning
- Agitador de vidrio
- Horno para deshidratar muestras
- Molino nixtamal con discos de hierro colado
- Comal de barro
- Licuadora casera marca Oster
- Balanza semianalítica

### 2. Ensayo IN VIVO (depleción y repleción)

#### REACTIVOS

- Dietas descritas en la tabla #1 y #2 de la sección de resultados
- Agua destilada desionizada
- Kit Merck de determinación de hemoglobina en sangre
- Heparina o EDTA como anticoagulantes
- Alcohol etílico como desinfectante

#### EQUIPO

- Bisturí y tijeras
- Algodón
- Tubos de ensayo de vidrio de 20 mL con tapadera Pyrex
- Pipeta volumétrica de vidrio, de 5 mL
- Micropipeta de 10 microlitros
- Celdas espectrofotométricas de vidrio
- Espectrofotómetro UV-VIS modelo ESPECTRONIC 21
- Balanza normal para pesaje de las ratas
- Guantes de latex para extracción de sangre de los animales

### 3. Ensayos IN VITRO

#### REACTIVOS

- Sal sódica de ácido fítico, pureza 97%
- Acido clorhídrico (HCl) concentrado

- HCl 0.2N
- Sulfato de hierro (III) y amonio 12 hidratado
- 2,2'-bipiridina
- Acido tioglicólico
- HCl (1+1: igual concentración de HCl concentrado y agua destilada)
- Acido nítrico (1+1)
- Agua destilada-desionizada
- Solución estándar de hierro de 1000 ppm
- Alfa-alfa dipiridilo
- Clorohidrato de hidroxilamina
- Nitrato de magnesio
- Acetato de sodio anhidro
- Acido acético glacial
- Solución estándar de hierro de 1.6 ppm
- Pepsina
- Hidróxido de sodio

#### EQUIPO

- Tubos de ensayo Pyrex de 25 mL con tapadera
- 4 beakers de 600 mL
- 8 beakers de 100 mL
- 4 estufas hot plate/stirer marca Corning
- Agitador orbital
- Sistema de filtrado con vacío y por gravedad
- Papel filtro Wattman No. 40
- Espectrofotómetro UV-VIS modelo SPECTRONIC 21
- Celdas espectrofotométricas de vidrio
- Piseta plástica para agua destilada
- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 5, 10 mL
- Bulbo de hule para succión
- Medidor digital de pH
- Balanza analítica de 4 decimales
- Balones de aforar de 25 mL, Pyrex
- 20 Crisoles de porcelana con tapadera
- Mufla, capacidad de calentar hasta 1200° C.
- Viales plásticos para alinacemamiento de muestras
- Espectrofotómetro de absorción atómica, UV-VIS, con llama de mezcla acetileno-oxígeno, con lámpara multielemento incluyendo hierro, e impresor Epson.
- Baño térmico para incubación a 37°C
- Centrifuga de 3000 revoluciones por minuto (rpm)
- Campana de extracción de gases

#### 4. Análisis de hierro hepático de las ratas

##### REACTIVOS

- HCl (1+1)
- Acido nítrico (1+1)
- Agua destilada desionizada
- Estándar de hierro de 1000 ppm

##### EQUIPO

- Bisturí de disección
- Guantes de latex
- Guillotina de acero inoxidable
- Balanza semianalítica
- Congelador para conservación de muestras
- Balanza analítica
- 20 Crisoles de porcelana con tapadera
- 3 Estufas Corning
- Mufla (1200°C)
- Campana de extracción de gases
- Espectrofotómetro de absorción atómica, UV-VIS, con llama de mezcla acetileno-oxígeno, con lámpara multielemento incluyendo hierro, e impresor Epson.
- Estándar de hierro de 1000 ppm

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

En la primera parte del proceso se realizó la preparación de las muestras de maíz, que posteriormente fueron utilizadas como alimento en la fase del ensayo biológico con ratas. La primera muestra consistió en maíz crudo, luego otra muestra de maíz se nixtamalizó utilizando 1.2% de cal relativo al peso del maíz y agua para un tiempo de cocción de 75 minutos y 8 horas de remojo, para obtener una segunda muestra de nixtamal; por último se prepararon tortillas con el resto del nixtamal y estas tortillas formaron la tercera muestra. Todas las muestras fueron transformadas en harina una vez fueron deshidratadas. Como parte de este proceso se evitaron dentro de lo posible las contaminaciones de hierro proveniente de otras fuentes que no fueran el maíz, tales como contaminaciones provenientes del agua, reactivos como carbonato de calcio para cocer el maíz, cristalería, molino nixtamal y comal.

Una vez preparadas estas muestras, se formularon las diferentes dietas experimentales a ser evaluadas en el ensayo biológico. Como se indica en la tabla #1, estas dietas fueron diez, dos con maíz crudo a diferentes concentraciones (62.5% y 75%), dos con masa a diferentes concentraciones (62.5% y 75%), dos con tortillas a diferentes concentraciones (62.5% y 75%). Cuatro dietas fueron para una curva de calibración donde la fuente de hierro no fue maíz sino sulfato ferroso como se indica en la tabla #2. La razón de la utilización del sulfato ferroso es que este compuesto es totalmente ionizable y absorbido por el organismo, con lo cual se quería establecer un patrón de comparación relativa entre la absorción del hierro del maíz y la absorción del hierro del sulfato ferroso. Tanto en la tabla 1 como en la tabla 2 se presenta el contenido de hierro en las dietas, calculado a partir del análisis de hierro en maíz, masa y tortillas, y del sulfato ferroso también.

**Tabla # 1**  
**Cantidades de ingredientes utilizados en la preparación de las dietas experimentales, incluyendo el contenido real de hierro medido en dichas dietas**

	DIETAS EXPERIMENTALES					
	A	B	C	D	E	F
Caseina (g)	141	141	141	141	141	141
L-metionina (g)	2	2	2	2	2	2
Mez. Vitaminas (g)	10	10	10	10	10	10
Minerales (-Fe) (g)	35	35	35	35	35	35
Aceite Veg. (g)	50	50	50	50	50	50
<b>Maíz (g)</b>	<b>625</b>	<b>750</b>	0	0	0	0
<b>Masa (g)</b>	0	0	<b>625</b>	<b>750</b>	0	0
<b>Tortilla (g)</b>	0	0	0	0	<b>625</b>	<b>750</b>
Almidón maíz (g)	137	12	137	12	137	12
<b>Total en gramos</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>
Contenido de hierro en <b>MgFe/g dieta</b>	<b>0.0109</b>	<b>0.0131</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.0150</b>	<b>0.0172</b>	<b>0.0206</b>

Nota: el maíz crudo, masa y tortilla se encontraban en forma de harina.

Fuente: UVG/INCAP, enero de 1999.

**Tabla # 2**  
**Contenido de las dietas de la curva de calibración con Sulfato ferroso**

	DIETAS mgFe/1000g dieta			
	G	H	I	J
Caseina (g)	141	141	141	141
L-metionina (g)	2	2	2	2
Mez. Vitaminas (g)	10	10	10	10
Minerales (-Fe) (g)	35	35	35	35
<b>Sulf. Ferroso (mg)</b>	<b>0*</b>	<b>24.87*</b>	<b>49.75*</b>	<b>74.63*</b>
Aceite Veg. (g)	50	50	50	50
Almidón maíz (g)	762	762	762	762
<b>Total en gramos</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>
Contenido de hierro en <b>MgFe/g dieta</b>	<b>0</b>	<b>0.0050</b>	<b>0.0099</b>	<b>0.0149</b>

Fuente: UVG/INCAP, enero de 1999

### A. Contenidos de ácido fítico, hierro total y hierro ionizable en maíz crudo, masa y tortilla

Como control para el ensayo biológico *in vivo* realizado con ratas se realizó una batería de análisis químicos e *in vitro* a cada una de las muestras de maíz (maíz crudo, masa y tortillas), para poder establecer una comparación entre los ensayos *in vivo* e *in vitro*. Los análisis incluyeron el ácido fítico, hierro total y hierro ionizable. Con estos resultados también fue posible estimar un valor de disponibilidad teórica del hierro del maíz, de acuerdo a la ecuación de Rao y Prabhavathi (1978).

**Tabla # 3**  
**Resultados de Acido Fítico medido en muestras de maíz crudo, masa y tortillas**

Muestra	Mg de Acido Fítico por 100 g de muestra	% de A. Fítico perdido
Maíz crudo	727	---
Masa	541	25.6
Tortilla	516	29.0

Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo 1999

**Tabla # 4**  
**Resultados de hierro total medido en muestras de maíz crudo, masa y tortillas**

Muestra	Mg de hierro por gramo de muestra
Maíz crudo	0.0175
Masa	0.0200
Tortillas	0.0275

Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo 1999

**Tabla # 5**  
**Resultados de hierro ionizable**  
**medido en muestras de maíz crudo, masa y tortillas**

Muestra	Mg de hierro por gramo de muestra
Maíz crudo	0.0025
Masa	0.0025
Tortillas	0.0023

Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo 1999

**Tabla # 6**  
**Resultados de % de disponibilidad IN VITRO realizado**  
**medido en muestras de maíz crudo, masa y tortillas**

Muestra	% Biodisponibilidad	Fe absorbido
Maíz crudo	14.28	7.21
Masa	12.50	6.37
Tortillas	8.36	4.42

Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo 1999

$$\% \text{ de hierro ionizable} = \frac{\text{mgFe ionizable}}{\text{mgFe total}} \times 100$$

$$\text{Hierro absorbido} = 0.4827 + 0.4707X$$

(Ecuación de Rao y Prabhavathi)

donde X es el valor de hierro ionizable a pH 7 y Y es el índice de hierro absorbido.

Los resultados de los ensayos químicos muestran que efectivamente el ácido fítico disminuyó considerablemente de la muestra de maíz crudo a la de masa y hubo otra leve disminución de la muestra de masa a la de tortilla; este descenso, que en total fue del 29%, fortalece el hecho de que sí es posible disminuir la cantidad de ácido fítico en el maíz a través del proceso de nixtamalización estrictamente bajo las condiciones utilizadas en este estudio para tal efecto, respecto de la concentración de cal, tiempo de cocción y tiempo de remojo. Sin embargo, haciendo alusión a las hipótesis planteadas en éste

estudio, la disminución de los niveles de ácido fítico debe incurrir directamente en el aumento significativo de los niveles de hierro ionizable, de tal forma que la disponibilidad teórica del hierro debe aumentar.

Observando los ensayos in vitro para hierro total y hierro ionizable, debe explicarse que para el hierro total (gráfica # 2 ) se esperaba que la cantidad en miligramos de hierro por gramo de muestra no fueran significativamente diferentes; ésto basado en que las pruebas realizadas, por espectrofotometría de absorción atómica de cenizas de las muestras, miden todo el hierro presente en la muestra, eliminando cualquier factor quelante, de tal forma que a excepción de contaminaciones con fuentes externas al maíz, la cantidad de hierro total en las tres muestras no debería ser tan diferente. Este no fue el caso reflejado por los análisis; como es notorio en la gráfica # 2, el nivel de hierro total aumenta hacia la muestra de masa a tortilla, considerablemente en esta última. Este fenómeno es explicable debido a que para la preparación de la masa y las tortillas, aunque se evitó al máximo, las muestras de maíz estuvieron expuestas a contaminación de hierro proveniente del molino de nixtamal que posee discos de hierro colado, donde se utiliza agua normal (municipal) para dicha molienda, y posteriormente la cocción de las tortillas en comal de barro, impregnado con cal y agua. Se sospecha también de la utilización de una licuadora de aspas metálicas para la preparación de las harinas respectivas en cada muestra.

Investigaciones previas en esta área sugieren que se espera un cierto aumento del hierro total conforme se avanza en el proceso hasta llegar a las tortillas, algunos lo atribuyen a cierto grado de contaminación y otros a factores como la concentración del contenido del grano luego de la producción de masa.

El ensayo in vitro de hierro ionizable por su parte muestra valores que no son significativamente diferentes (gráfica # 3 ), lo cual contrasta con la teoría de que por disminuir el ácido fítico aumentaría directamente el hierro ionizable. Por ende al calcular

el índice de disponibilidad, que no es más que el cociente entre el valor del hierro ionizable y el valor del hierro total expresado en porcentaje, se observa que no hay aumento de la disponibilidad de maíz crudo a masa, mas bien existe una disminución de maíz a masa, otra de masa a tortilla; estos resultados no son sustanciales para apoyar o validar la teoría de que la disminución del ácido fítico aumenta significativamente la biodisponibilidad del hierro en el maíz. Es menester indicar que tampoco estos resultados invalidan dicha teoría, pero dan una muestra de que deben realizarse nuevos ensayos para demostrar dicho fenómeno, que en este caso no fue detectable.

### **B. Depleción de hemoglobina en los animales**

Paralelamente a la preparación de las muestras y dietas con maíz y sulfato ferroso, se inició el ensayo biológico; para esto se tomó una población inicial de 104 ratas blancas de laboratorio de raza Whinstar de 23 días de nacidas, con una distribución de 50 machos y 54 hembras. Se inició con dichas ratas el proceso de depleción de hemoglobina, administrándoles una dieta libre de hierro, cuya composición puede encontrarse en la tabla # 7, además agua destilada-desionizada, puestas en jaulas individuales de acero inoxidable y con comederos y bebederos de vidrio y acero inoxidable respectivamente. Con todas estas medidas se trató de evitar la ingesta de hierro de cualquier fuente por el término de cuatro semanas, que es el tiempo propuesto en los protocolos de este tipo de ensayos biológicos.

**Tabla # 7**  
**Dieta basal baja en hierro**

<b>Componente</b>	<b>g/Kg</b>
Caseína	141
L-Metionina	2
Mezcla vitamínica *	22
Mezcla mineral (no Fe)*	35
Aceite vegetal	50
Almidón de maíz	750

*\* Para este caso se utilizaron mezclas vitamínicas y minerales ya preparadas comercialmente, las cuales estaban libres de hierro.*

Durante el proceso de depleción se llevaron controles del peso de los animales y sus cambios en niveles de hemoglobina; fue dicho descenso de hemoglobina lo que se esperaba, por lo que semanalmente se analizaban muestras aleatorias de aproximadamente el 25% de la población, dichos muestreos pueden observarse en el apéndice B. La etapa de depleción de las ratas se extendió hasta un período de 12 semanas.

En el apéndice A se muestran los valores del peso semanal medido en los animales durante la etapa de depleción, además que se pueden observar los distintos muestreos de sangre realizados para controlar el descenso de hemoglobina de las ratas.

### **C. Repleción de hemoglobina en los animales**

Una vez terminada la etapa de depleción se realizó un muestreo general con las ratas que sobrevivieron el proceso de depleción (85), y se escogió una muestra de 40 animales que estaban en los mejores valores de hemoglobina para el estudio. Los valores de hemoglobina oscilaron entre 7 y 12 g/dL. Debido a que fueron 40 animales escogidos, se asignaron 4 ratas a cada grupo, y se balancearon los grupos de tal forma que el promedio de hemoglobina de cada uno fuera similar. Una vez establecidos los grupos se administraron las diez dietas experimentales para la repleción de hemoglobina por el término de doce días. Los animales fueron alimentados una vez al día, administrándoles de 10 a 25 gramos de alimento por rata, hasta llegar a completar 205 gramos de alimento administrado durante los doce días a cada rata. El alimento no se administró *ad libitum*, y sí en el caso del agua. Al terminar el período de doce días de repleción se tomaron muestras de sangre a todas las ratas para establecer el aumento en hemoglobina y realizar todos los cálculos pertinentes hasta llegar a la estimación de diferentes índices de biodisponibilidad.

En las tablas #8,9,10,11,12 y 13 se presentan los resultados de los parámetros medidos en las ratas que ingresaron al proceso del ensayo biológico; se presentan primero los resultados para las ratas sometidas a las dietas experimentales con maíz, masa y tortillas (dietas de la A a la F según la tabla #1) y luego los resultados de las ratas de la curva de calibración con sulfato ferroso (dietas de la G a la J según tabla #2). En la sección de apéndices se muestran los diferentes parámetros medidos a todo el grupo inicial durante el ensayo de depleción (104 ratas).

**Tabla # 8**  
**Resultados de hemoglobina y peso de las**  
**ratas que entraron al ensayo biológico de depleción-repleción**

	Código	# rata	(g/dL) Hb inicial	(g/dL) Hb final	(g/dL) Cambio Hb	(g) Peso inicial	(g) peso final
<b>MAIZ</b>	<b>A2</b>	13	11.0	10.5	-0.5	249	309
<b>CRUDO</b>	<b>A3</b>	58	11.2	10.8	-0.4	171	242
<b>62.50%</b>	<b>A4</b>	60	11.3	12.7	1.4	157	220
<b>MAIZ</b>	<b>B1</b>	29	11.0	11.6	0.6	238	316
<b>CRUDO</b>	<b>B2</b>	49	7.2	9.6	2.4	219	296
<b>75%</b>	<b>B4</b>	104	10.7	12.3	1.6	198	259
<b>MASA</b>	<b>C1</b>	2	10.9	11.0	0.1	248	321
<b>62.5%</b>	<b>C4</b>	66	11.4	11.1	-0.3	162	227
<b>MASA</b>	<b>D1</b>	16	10.7	11.2	0.5	293	363
<b>75%</b>	<b>D2</b>	44	8.3	9.5	1.2	239	334
<b>TORT.</b>	<b>E1</b>	34	9.2	9.9	0.7	273	377
<b>62.5%</b>	<b>E3</b>	52	9.9	9.7	-0.2	201	262
<b>TORT.</b>	<b>F2</b>	33	9.6	11.6	2.0	264	339
<b>75%</b>	<b>F3</b>	67	11.6	13.2	1.6	182	240

**Nota:** cada rata tiene asignado un código que depende del grupo del ensayo al que pertenece además de tener un propio número desde su nacimiento. **Hb ini:** hemoglobina al inicio de la repleción. **Hb fin:** hemoglobina al final de la repleción. **Peso ini, y fin:** peso inicial y final respectivamente. **Fuente:** UVG/INCAP, enero-febrero 1999.

**Tabla # 9**  
**Volúmenes sanguíneos calculados, contenidos de hierro**  
**calculados a partir de hemoglobina y volumen sanguíneo.**  
**Total de hierro ganado en hemoglobina durante el ensayo**

		(mL sangre)	(mL sangre)	(mg Fe )	(mg Fe)	(mg Fe)
	Código	Vol. inicial	Vol. final	Fe inicial	Fe final	difer. Fe
<i>MAIZ</i>	<b>A2</b>	16.68	20.70	6.15	7.28	<b>1.13</b>
<i>CRUDO</i>	<b>A3</b>	11.46	16.21	4.30	5.87	<b>1.57</b>
<b>62.50%</b>	<b>A4</b>	10.52	14.74	3.98	6.27	<b>2.29</b>
<i>MAIZ</i>	<b>B1</b>	15.95	21.17	5.88	8.23	<b>2.35</b>
<i>CRUDO</i>	<b>B2</b>	14.67	19.83	3.54	6.38	<b>2.84</b>
<b>75%</b>	<b>B4</b>	13.27	17.35	4.76	7.15	<b>2.40</b>
<i>MASA</i>	<b>C1</b>	16.62	21.51	6.07	7.93	<b>1.86</b>
<b>62.5%</b>	<b>C4</b>	10.85	15.21	4.15	5.66	<b>1.51</b>
<i>MASA</i>	<b>D1</b>	19.63	24.32	7.04	9.13	<b>2.09</b>
<b>75%</b>	<b>D2</b>	16.01	22.38	4.45	7.12	<b>2.67</b>
<i>TORT.</i>	<b>E1</b>	18.29	25.26	5.64	8.38	<b>2.74</b>
<b>62.5%</b>	<b>E3</b>	13.47	17.55	4.47	5.70	<b>1.24</b>
<i>TORT.</i>	<b>F2</b>	17.69	22.71	5.69	8.83	<b>3.14</b>
<b>75%</b>	<b>F3</b>	12.19	16.08	4.74	7.11	<b>2.37</b>

**Nota:** Vol. inic y fin: volumen sanguíneo inicial y final calculados a partir del peso del animal al inicio y al final del ensayo de repleción. **Fe ini. y fin.:** miligramos de hierro calculados a partir del volumen sanguíneo y los valores de hemoglobina de la tabla anterior. **Dif. Fe:** diferencia de hierro del estado inicial al final (**hierro ganado durante el ensayo**).

**Fuente:** UVG/INCAP, enero-febrero 1999.

Fórmulas utilizadas:

$$\text{Volumen sanguíneo} = \text{peso rata (g)} \times \frac{0.067 \text{ mL sangre}}{1 \text{ g peso rata}}$$

$$\text{mgFe en Hb} = \text{Vol. sang. (mL)} \times \frac{\text{g Hb}}{100 \text{ mL sang.}} \times \frac{3.35 \text{ mgFe}}{\text{g Hb}}$$

$$\text{Diferencia de mgFe en Hb} = \text{mgFe}_{\text{final}} - \text{mgFe}_{\text{inicial}}$$

**Tabla # 10**  
**Resultados de hemoglobina y peso de las**  
**ratas que entraron al ensayo biológico de depleción-repleción**  
**Grupo de la curva de calibración con sulfato ferroso**

mgFe/Kg de dieta	Código	# rata	(g/dL) Hb inicial	(g/dL) Hb final	(g/dL) dif Hb	(g) Peso inicial	(g) peso final
<b>curva 0</b>	<b>G1</b>	12	9.2	10.3	1.1	251	300
	<b>G2</b>	21	10.7	9.4	-1.3	267	321
	<b>G3</b>	77	9.7	9.0	-0.7	179	223
	<b>G4</b>	102	11.6	12.0	0.4	183	221
<b>curva 5</b>	<b>H1</b>	11	10.3	11.8	1.5	267	318
	<b>H2</b>	27	9.6	9.2	-0.4	229	284
	<b>H3</b>	79	11.6	12.9	1.3	206	225
	<b>H4</b>	103	9.6	11.4	1.8	177	233
<b>Curva 10</b>	<b>I1</b>	35	10.1	11.2	1.1	254	297
	<b>I2</b>	40	9.9	11.8	1.9	180	235
	<b>I3</b>	69	9.8	12.5	2.7	167	229
	<b>I4</b>	92	11.4	14.3	2.9	162	216
<b>curva 15</b>	<b>J1</b>	46	9.9	12.5	2.6	262	323
	<b>J2</b>	50	10.3	13.3	3.0	246	316
	<b>J3</b>	57	12.0	14.0	2.0	195	242
	<b>J4</b>	71	8.1	10.5	2.4	211	238

**Nota:** cada rata tiene asignado un código que depende del grupo del ensayo al que pertenece además de tener un propio número desde su nacimiento. **Hb ini:** hemoglobina al inicio de la repleción. **Hb fin:** hemoglobina al final de la repleción. **Peso ini, y fin:** peso inicial y final respectivamente. **Fuente:** UVG/INCAP, enero-febrero 1999.

**Tabla # 11**  
**Volúmenes sanguíneos calculados, contenidos de hierro**  
**calculados a partir de hemoglobina y volumen sanguíneo.**  
**Total de hierro ganado en hemoglobina durante el ensayo**  
**Grupo de la curva de calibración con sulfato ferroso**

		(mL sangre)	(mL sangre)	(mg Fe )	(mg Fe)	(mg Fe)
	Código	Vol. inicial	Vol. final	Fe inicial	Fe final	Difer. Fe
<b>curva 0</b>	<b>G1</b>	16.82	20.10	5.18	6.94	<b>1.75</b>
	<b>G2</b>	17.89	21.51	6.41	6.77	<b>0.36</b>
	<b>G3</b>	11.99	14.94	3.90	4.50	<b>0.61</b>
	<b>G4</b>	12.26	14.81	4.76	5.95	<b>1.19</b>
						<b>Promedio</b>
<b>curva 5</b>	<b>H1</b>	17.89	21.31	6.17	8.42	<b>2.25</b>
	<b>H2</b>	15.34	19.03	4.93	5.86	<b>0.93</b>
	<b>H3</b>	13.80	15.08	5.36	6.51	<b>1.15</b>
	<b>H4</b>	11.86	15.61	3.81	5.96	<b>2.15</b>
						<b>Promedio</b>
<b>curva 10</b>	<b>I1</b>	17.02	19.90	5.76	7.47	<b>1.71</b>
	<b>I2</b>	12.06	15.75	4.00	6.22	<b>2.22</b>
	<b>I3</b>	11.19	15.34	3.67	6.42	<b>2.75</b>
	<b>I4</b>	10.85	14.47	4.15	6.93	<b>2.79</b>
						<b>Promedio</b>
<b>Curva 15</b>	<b>J1</b>	17.55	21.64	5.82	9.06	<b>3.24</b>
	<b>J2</b>	16.48	21.17	5.69	9.43	<b>3.75</b>
	<b>J3</b>	13.07	16.21	5.25	7.60	<b>2.35</b>
	<b>J4</b>	14.14	15.95	3.84	5.61	<b>1.77</b>
						<b>Promedio</b>

**Nota:** **Vol. inic** y **fin:** volumen sanguíneo inicial y final calculados a partir del peso del animal al inicio y al final del ensayo de repleción. **Fe ini. y fin.:** miligramos de hierro calculados a partir del volumen sanguíneo y los valores de hemoglobina de la tabla anterior. **Dif. Fe:** diferencia de hierro del estado inicial al final (**hierro ganado durante el ensayo**). **Fuente:** UVG/INCAP, enero-febrero 1999.

Formulas utilizadas:

$$\text{Volumen sanguíneo} = \text{peso rata (g)} \times \frac{0.067 \text{ mL sangre}}{1 \text{ g peso rata}}$$

$$\text{mgFe en Hb} = \text{Vol. sang. (mL)} \times \frac{\text{g Hb}}{100 \text{ mL sang.}} \times \frac{3.35 \text{ mgFe}}{\text{g Hb}}$$

$$\text{Diferencia de mgFe en Hb} = \text{mgFe}_{\text{final}} - \text{mgFe}_{\text{inicial}}$$

Tabla # 12

Resultados para la regresión lineal entre las variables  
**X= mg de hierro provenientes del sulfato ferroso** (calculado sobre una ingesta de 205g de dieta por rata)  
**Y= mg de hierro ganados en el estudio** (medido por hemoglobina)

X	Y
0.000	0.98
1.026	1.62
2.047	2.37
3.069	2.78

$$r = 0.9939$$

$$Y = 0.6011X + 1.0142$$

Tabla # 13

Valores calculados de mgFe de sulfato ferroso relativo a los mgFe ganados por las ratas alimentadas con maíz, masa y tortillas

Rata	X	MgFe ingeridos de de las dieta experimentales (*)	Valor Biológico Relativo (%)
A2	0.19	2.2345	8.50
A3	0.92	2.2345	41.17
A4	2.12	2.2345	94.87
B1	2.24	2.6855	83.41
B2	3.04	2.6855	113.20
B4	2.31	2.6855	86.01
C1	1.41	2.5625	55.02
C4	0.99	2.5625	38.63
D1	1.79	3.075	58.21
D2	2.75	3.075	89.43
E1	2.87	3.526	81.39
E3	0.38	3.526	10.77
F2	3.54	4.223	83.82
F3	2.26	4.223	53.51

(\*) mgFe calculados sobre una ingesta pareja de 205g de dieta.

Fuente: UVG, enero-marzo 1999.

Cálculos para la tabla anterior (#13):

$$\text{VBR} = \frac{\text{mgFe sulf.ferr. (por reg. Lineal)}}{\text{mgFe ingeridos en dieta}} \times 100$$

Se esperaba que los ensayos *in vivo* fueran respaldados por los ensayos *in vitro*. Después de observar los reportes de otros ensayos biológicos relacionados a depleción-repleción de hemoglobina en sangre de ratas, se decidió utilizar toda la información obtenida del estudio para expresar la biodisponibilidad del hierro del maíz en tres diferentes índices. En la tabla #14, #15 y #16, se observan los valores para dichos índices y es interesante observar que el índice #1 de eficiencia de regeneración de hemoglobina (en %) muestra valores con una tendencia a la disminución yendo de maíz crudo hasta tortilla, mientras que los índices #2 de hierro disponible para regeneración de hemoglobina y el #3 que es el hierro disponible para uso biológico relativo (no en %) tienen una tendencia similar entre ellos pero diferente a la del índice #1. Para los resultados del ensayo *in vivo*, los resultados del índice #1 (Eficiencia de Regeneración de Hemoglobina) son los más confiables ya que resultan directamente de los resultados obtenidos para hierro ganado en hemoglobina y hierro administrado ingerido por la rata.

Se realizó un análisis estadístico de medias donde los resultados sugieren que no hay diferencia estadística significativa entre las medias del índice #1 de Eficiencia de Regeneración de Hemoglobina para maíz crudo, masa y tortillas, ya que aunque los valores en porcentaje son diferentes, provienen de muestras muy pequeñas con varianzas muy grandes. Esto significa que se tiene muy poca evidencia estadística para afirmar que *in vivo*, la disminución del nivel del ácido fítico por medio de la cocción húmeda del maíz incide en una disminución significativa de la biodisponibilidad del hierro del maíz, por lo que debe enfatizarse en que los resultados no tienen el suficiente soporte estadístico como para rechazar o validar la hipótesis planteada, aunque lo que se esperaba era que la disminución del nivel del ácido fítico aumentara la biodisponibilidad del hierro en las muestras. Esto en cierta forma parece similar a lo sucedido con la

biodisponibilidad del hierro in vitro, como se muestra a continuación en dichos resultados, donde la diferencia entre las medias de maíz crudo, masa y tortilla tampoco son sustanciales.

**Tabla # 14**  
**Indice de biodisponibilidad %HRE (Porcentaje de Eficiencia de regeneración de hemoglobina) INDICE 1**

<b>Muestra</b>	<b>HRE (%)</b>
Maiz crudo 62.5%	74.44
Maiz crudo 75%	94.21
<b>Promedio</b>	<b>84.31</b>
Masa 62.5%	65.75
Masa 75%	77.39
<b>Promedio</b>	<b>71.57</b>
Tortilla 62.5%	56.43
Tortilla 75%	65.23
<b>Promedio</b>	<b>60.89</b>

Cálculos para obtener HRE:

$$\text{HRE} = \frac{\text{mgFe ganados en Hb}}{\text{mgFe ingeridos dieta}} \times 100$$

**Tabla # 15**  
**Indice de hierro disponible para regeneración de hemoglobina**  
**INDICE 2**

<b>Muestra</b>	<b>INDICE 2</b> <b>MgFe/100g dieta</b>
Maiz crudo 62.5%	0.8114
Maiz crudo 75%	1.2358
<b>Promedio</b>	<b>1.0236</b>
Masa 62.5%	0.8463
Masa 75%	1.1610
<b>Promedio</b>	<b>1.0036</b>
Tortilla 62.5%	0.9707
Tortilla 75%	1.3439
<b>Promedio</b>	<b>1.1573</b>

Cálculos para obtener el INDICE 2:

$$\text{INDICE 2} = \frac{\text{mgFe ganados en Hb}}{\text{mgFe ingeridos dieta}} \times \text{mgFe/100g de dieta}$$

**Tabla # 16**  
**Valor Biológico Relativo (promedios), Índice de hierro disponible para uso biológico INDICE 3**

Muestra	Valor Biológico Relativo (unidad)	Contenido hierro en dieta mgFe/100g	INDICE 3 MgFe por 100g dieta
Maíz crudo 62.5%	0.4818	1.09	0.5252
Maíz crudo 75%	0.9420	1.31	1.2342
<b>Promedio</b>			<b>0.8797</b>
Masa 62.5%	0.4682	1.25	0.5854
Masa 75%	0.7382	1.50	1.1074
<b>Promedio</b>			<b>0.8464</b>
Tortilla 62.5%	0.4608	1.72	0.7927
Tortilla 75%	0.6866	2.06	1.4147
<b>Promedio</b>			<b>1.1037</b>

Cálculos para obtener el INDICE 3:

$$\text{INDICE 3} = \frac{\text{mgFe ganados en Hb}}{\text{mgFe ingeridos dieta}} \times \text{Val. Biol. Relativo}$$

#### **D. Relación entre los ensayos *in vitro* e *in vivo***

Es interesante destacar que los valores *in vitro* para la disponibilidad del hierro son obtenidos del hierro total y hierro ionizable del maíz crudo, masa y tortilla como tal, mientras que los valores de biodisponibilidad *in vivo* obtenidos en el ensayo con las ratas son una muestra relativa a la ganancia de hemoglobina en la sangre de la rata en base a la cantidad de hierro consumida. No obstante el hierro organismal que puede encontrarse en la hemoglobina representa alrededor del 60% a 70% de hierro total.

Es evidente en ambos casos que tanto la disponibilidad *in vitro* como la biodisponibilidad *in vivo* disminuye de maíz a masa y de masa a tortilla, esto puede verse en la gráfica #8,

la cual compara ambos estudios. Debe agregarse sin embargo, que no se puede asegurar que sólo la disminución del ácido fítico tiene una relación directa en la disminución o aumento en la biodisponibilidad del hierro del maíz, ya que existen otros factores como la fibra dietética o el calcio que no fueron estudiados en este proyecto de investigación. Podría ser el caso que los niveles de ácido fítico disminuyan, pero los niveles de fibra dietética aumenten y quelen de mayor forma al hierro, lo cual incide directamente en una disminución de la biodisponibilidad del hierro.

En la discusión de los resultados para los ensayos *in vivo* se explicó la diferencia entre los índices de biodisponibilidad *in vivo* versus *in vitro*, y de dónde provienen los datos para dicho cálculo en cada caso. Una vez explicada esta diferencia, se insiste en el punto en que aunque los valores de disponibilidad *in vitro* versus *in vivo* son diferentes, y cada ensayo por su lado tuvo sus respectivas incertidumbres y fallas, ambos ensayos mostraron la misma tendencia, hacia que la biodisponibilidad disminuye conforme el maíz se cocina desde crudo hasta tortilla, ahora puesto que los ensayos, especialmente *in vivo*, fueron realizados con muestras muy pequeñas, se realizó un análisis estadístico de diferencia de medias con variaciones grandes para muestras pequeñas y los resultados muestran que las medias de los resultados *in vivo* no son estadísticamente diferentes y por ende concluyentes, por lo que a partir de los resultados se puede concluir únicamente que la información no es suficiente como para aceptar o rechazar las hipótesis planteadas para este estudio.

#### **E. Resultados sobre niveles de hierro en los hígados de las ratas utilizadas en el ensayo biológico *in vivo***

En el último paso del ensayo biológico se disectaron todas las ratas estudiadas para obtener el valor del hierro en hígado y poder establecer una relación entre la ingesta de hierro, el nivel de hierro en el hígado y la ganancia o pérdida de hemoglobina por cada rata. Los resultados de esta parte del estudio no mostraron un patrón que permitiera

relacionar las variables antes mencionadas, por lo que no se obtuvo ninguna conclusión a este respecto.

Como se presentó en la revisión de literatura, aunque el hígado es un reservorio de hierro para el organismo, no es el único, y pareciera ser que tampoco es el más importante. Parece ser que tiende a almacenarse más hierro en el vaso y en la médula ósea, esto debido a que en estos órganos se lleva a cabo la producción de células rojas nuevas. Se ha estudiado que dividido entre los tres órganos reservorios de hierro (hígado, vaso y médula ósea) se guarda alrededor del 10% del hierro total del organismo únicamente, y algunos estudios sugieren que el intercambio de hierro entre la sangre y dichos reservorios es muy lenta. Tomando en cuenta esta información, los resultados obtenidos en este proyecto de investigación muestran que es muy difícil establecer una correlación entre el hierro hepático y la hemoglobina en sangre, ya que dichos niveles pueden cambiar arbitrariamente de organismo a organismo.

**Tabla # 17**  
**Resultados sobre niveles de hierro en el hígado**  
**de las ratas que ingresaron al ensayo biológico**

Rata	Hierro hepático mg Fe total	mgFe de Hb ganado
<b>M. CRUDO 62.5%</b>		
A1	<b>0.2458</b>	3.77
A2	<b>0.2455</b>	1.13
A3	<b>0.1797</b>	1.57
A4	<b>0.2384</b>	2.29
prom	<b>0.2273</b>	
<b>MAIZ CRUDO 75%</b>		
B1	<b>0.2484</b>	2.35
B2	<b>0.2055</b>	2.84
B3	<b>0.1283</b>	4.67
B4	<b>0.2933</b>	2.40
Prom	<b>0.2189</b>	
<b>MASA 62.5%</b>		
C1	<b>0.2817</b>	1.86

C2	<b>0.2931</b>	3.38
C3	<b>0.5457</b>	0.75
C4	<b>0.3292</b>	1.51
Prom	<b>0.3624</b>	
<b>MASA 75%</b>		
D1	<b>0.4588</b>	2.09
D2	<b>0.4116</b>	2.67
D4	<b>0.3129</b>	0.11
Prom	<b>0.3944</b>	
<b>TORTILLA 62.5%</b>		
E1	<b>0.2921</b>	2.74
E2	<b>0.5071</b>	4.71
E3	<b>0.2646</b>	1.24
E4	<b>0.2265</b>	0.56
Prom	<b>0.3226</b>	
<b>TORTILLA 75%</b>		
F1	<b>0.3556</b>	-0.59
F2	<b>0.2313</b>	3.14
F3	<b>0.2306</b>	2.37
F4	<b>0.3046</b>	0.61
Prom	<b>0.2805</b>	

<b>Rata</b>	<b>mgFe hig.</b>	<b>MgFe de Hb ganado</b>
<b>CURVA 0 mgFe/Kg</b>		
G1	<b>0.3614</b>	1.75
G2	<b>0.2199</b>	0.36
G3	<b>0.2695</b>	0.61
G4	<b>0.2951</b>	1.19
Prom	<b>0.2865</b>	
<b>CURVA 5 mgFe/Kg</b>		
H1	<b>0.2415</b>	2.25
H2	<b>0.2918</b>	0.93
H3	<b>0.1848</b>	1.15
H4	<b>0.0876</b>	2.15
Prom	<b>0.2014</b>	
<b>CURVA 10 mgFe/Kg</b>		
I1	<b>0.3016</b>	1.71
I2	<b>0.3749</b>	2.22
I3	<b>0.4147</b>	2.75
I4	<b>0.3762</b>	2.79
Prom	<b>0.3669</b>	

CURVA 15 MgFe/Kc		
J1	<b>0.5164</b>	3.24
J2	<b>0.6853</b>	3.75
J3	<b>0.3415</b>	2.35
J4	<b>0.2699</b>	1.77
Prom	<b>0.4533</b>	

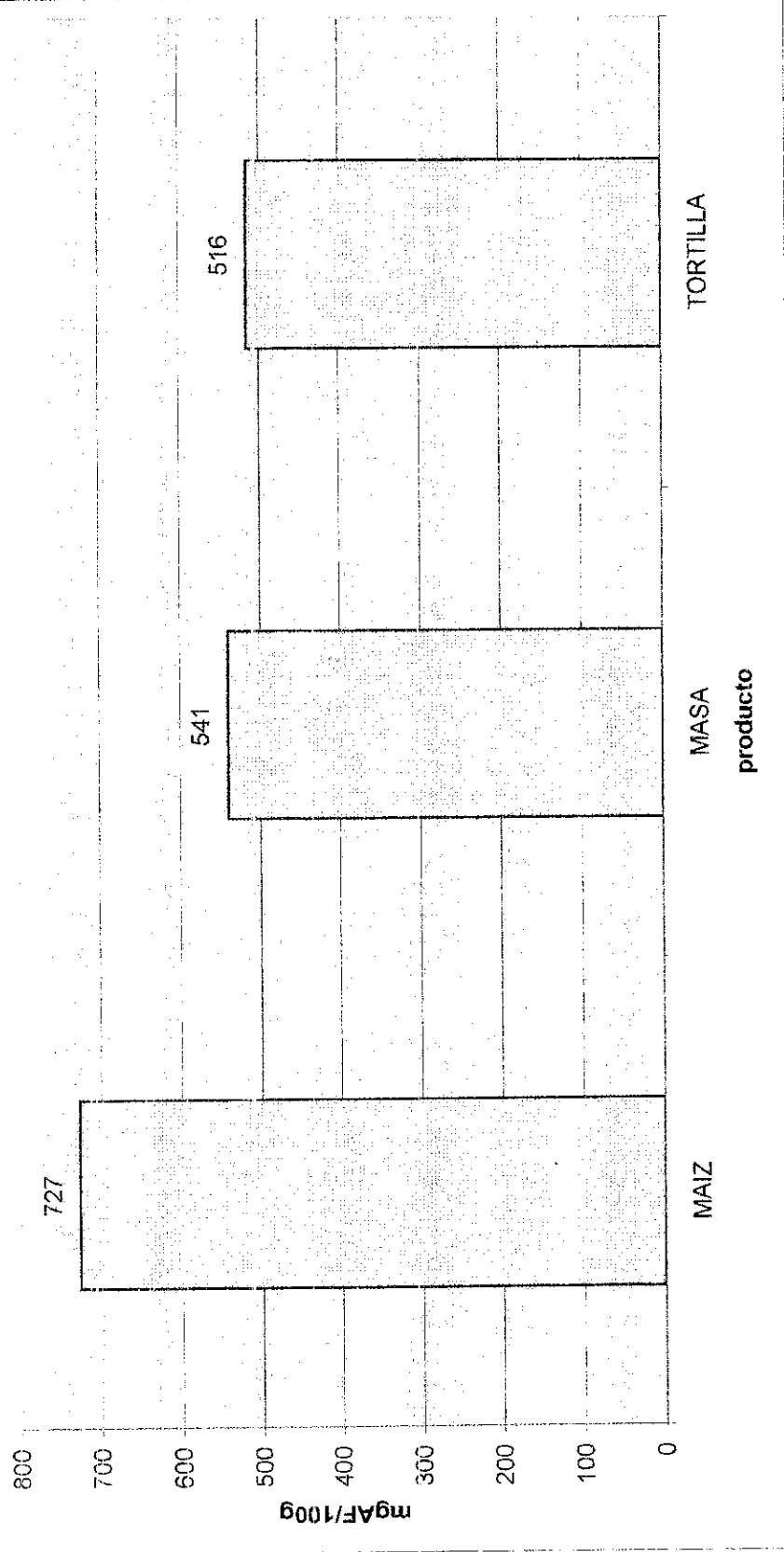
Fuente: UVG/INCAP, marzo 1999.

Al observar el desarrollo general de la experimentación se concluye que dentro de los puntos clave donde debe hacerse un cambio para estudios similares en un futuro destacan los siguientes:

1. **Contaminación:** dentro de la preparación de las muestras y las dietas fue evidente que la contaminación con hierro por fuentes externas. Esta contaminación se hace evidente al observar los resultados de hierro total en las muestras de maíz crudo, masa y tortilla. Este ingreso de hierro a las muestras proviene seguramente del molino de nixtamal, del comal de barro y molino para la preparación de harinas.
2. **Homogenización:** la homogenización de las dietas también es un factor que puede influir directamente en una ingesta pareja de dieta por los animales de un mismo grupo experimental. La mezcla de miligramos de sulfato ferroso (ver tabla #2) para hacer un kilo de alimento, implica un procedimiento de disolución bastante riguroso, mucho mayor al que se utilizó para las mezclas de las dietas usadas en este estudio.
3. **Alimentación de los animales:** La alimentación de los animales del experimento se hizo de una forma limitada, puesto que al proveerles con una cantidad constante de alimento se está limitando al organismo del animal, que podría responder de forma muy diferente al ingerir cantidades mayores a 205 gramos que fue la ingesta promedio de este estudio. La forma adecuada debe ser *ad libitum*, que implica que la rata consumiera conforme a sus necesidades de alimento.

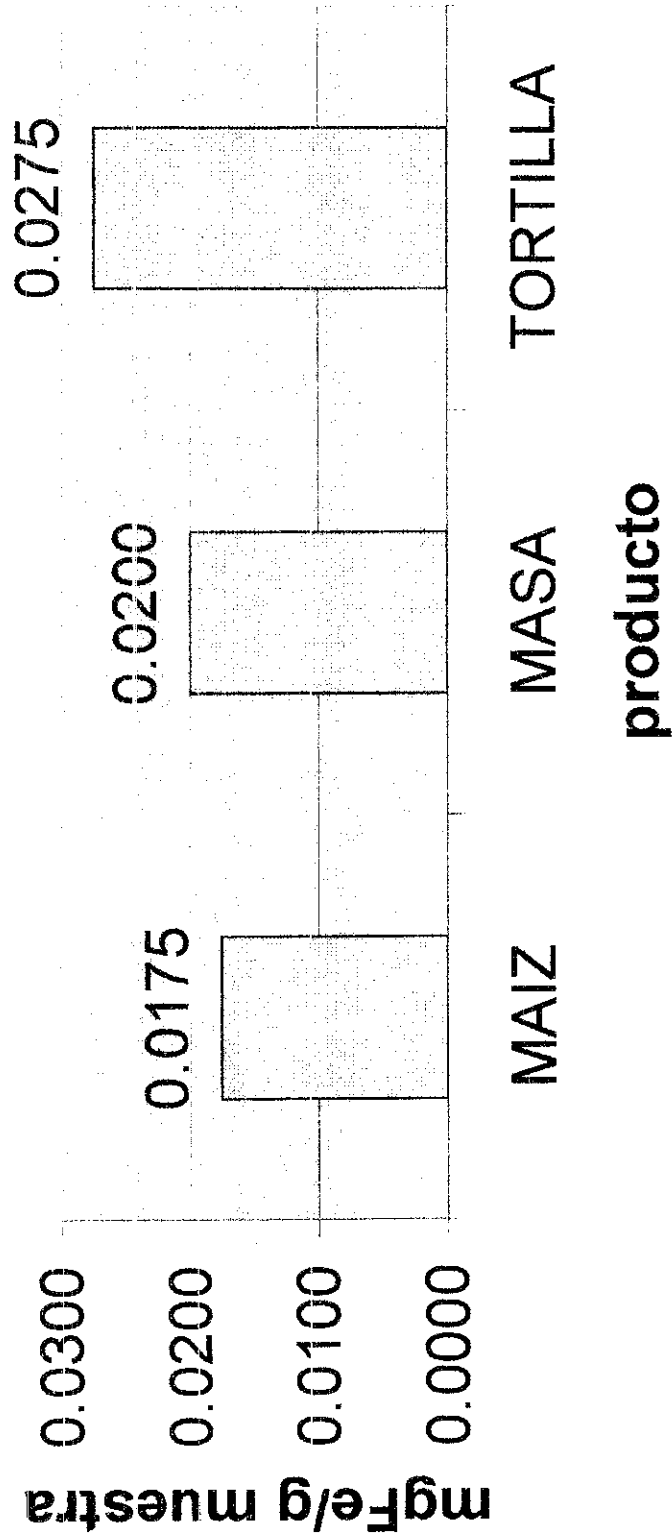
4. **Depleción de los especímenes:** se debe prever la depleción temprana de los animales ya que de lo contrario el proceso de depleción se extiende mucho más de la cuenta como en este caso, donde la depleción duró 12 semanas; el problema que se enfrenta luego de un tiempo prolongado es que los animales ya están en una edad no recomendable para el estudio y los resultados también pueden estar influidos por este factor, además de que el organismo del animal ha estado expuesto por mucho tiempo a un shock funcional, por lo que puede inducirse en el animal un daño irreversible en su organismo y al iniciar la repleción el animal no responderá adecuadamente.
  
5. **Tamaño de la muestra:** se debe contemplar la utilización final de un número mayor de animales para cada grupo experimental, de tal forma que los resultados puedan ser estadísticamente significativos. Hay que tomar en cuenta que algunos animales no resisten el proceso de depleción y que debe tratarse de mantenerse una distribución balanceada de machos y hembras.
  
6. **Control de otros factores como el calcio y la fibra:** es importante mencionar que tampoco puede establecerse una directa relación de causa y efecto entre el descenso del nivel del ácido fítico y el descenso de la biodisponibilidad del hierro, ya que no se controlaron otras variables como el calcio y en especial la fibra dietética que se sabe también juegan un papel importante en disminuir la biodisponibilidad del hierro. Es necesario controlar estas otras variables para poder validar una hipótesis como la planteada para no incurrir en errores por generalizaciones de algo que no se investigó.

**Grafica #1. Comportamiento del Acido Fítico *in Vitro***



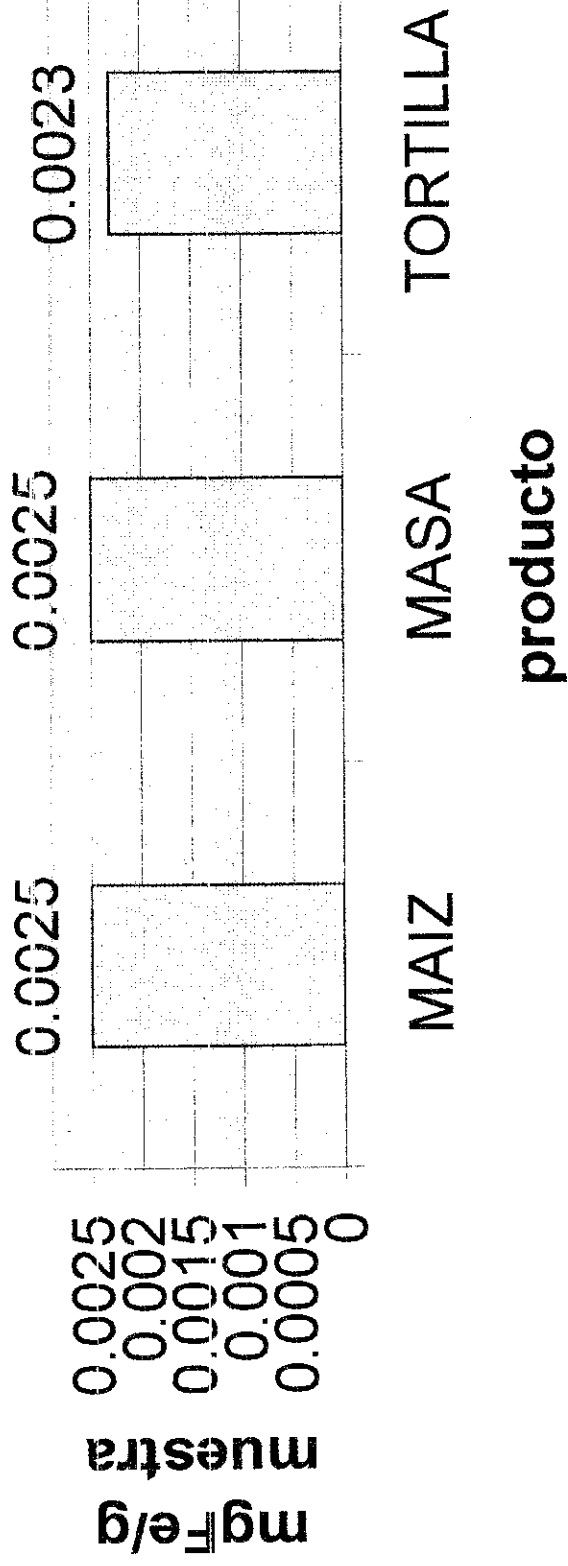
Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo, 1999. Datos provenientes de la tabla #3.

**Grafica #2. Comportamiento del hierro total**



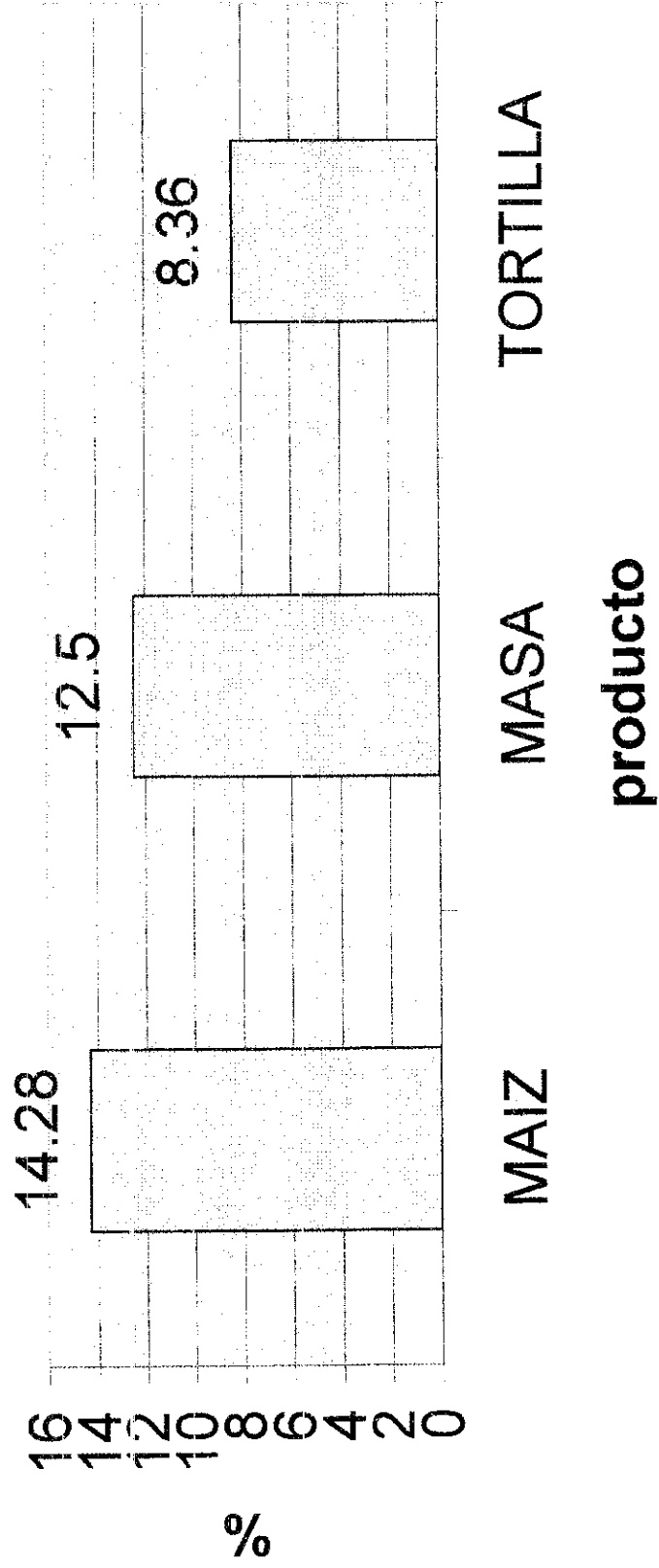
Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo, 1999. Datos obtenidos de la tabla #4.

### Grafica #3. Comportamiento del hierro ionizable durante el procesamiento del maíz



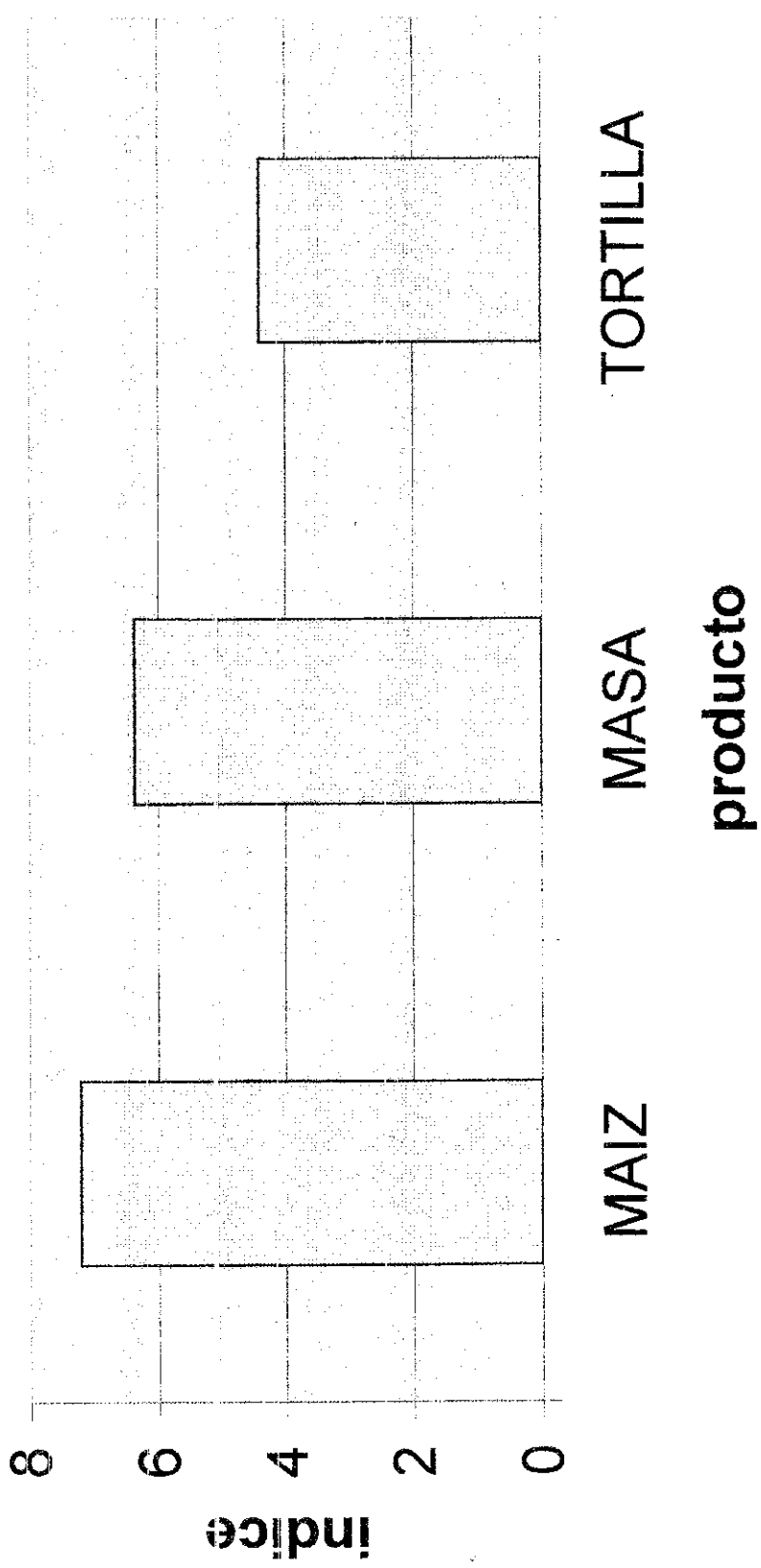
Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo, 1999. Datos obtenidos de la tabla #5.

**Grafica #4. % de hierro ionizable in  
vstro de las muestras**



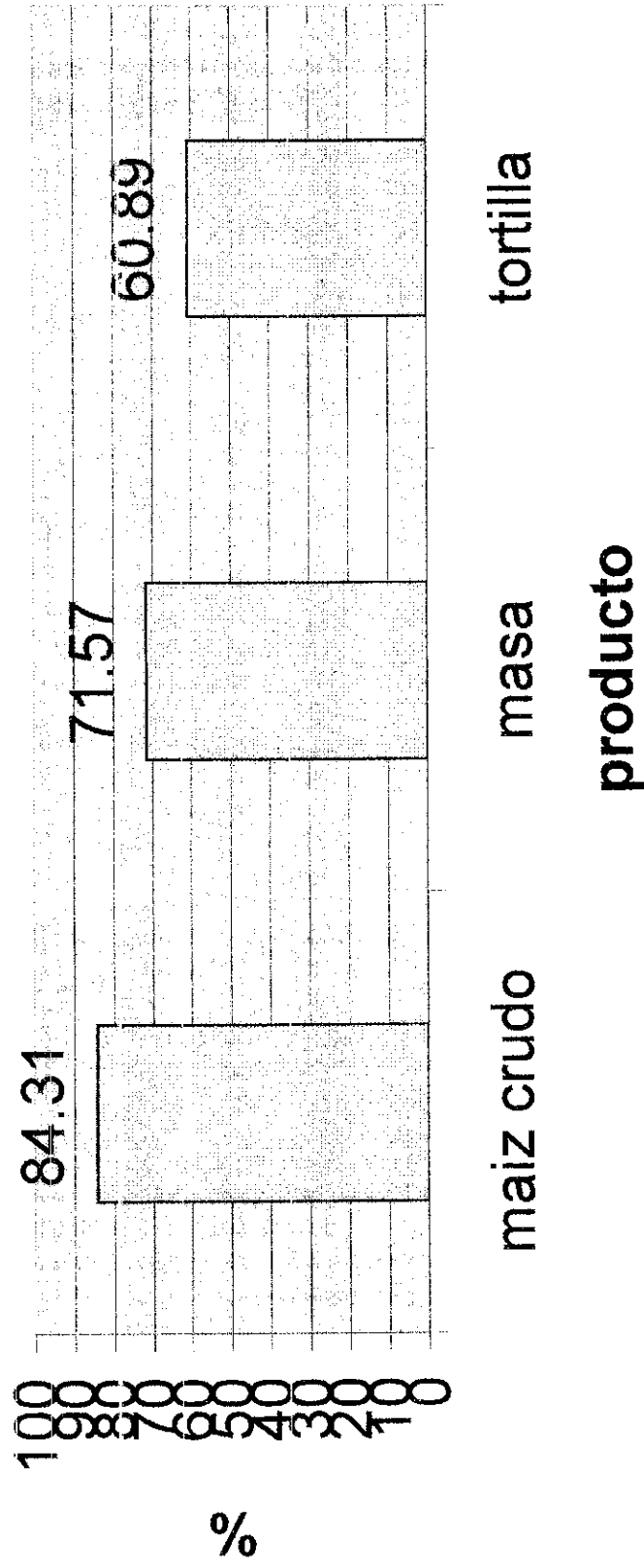
Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo, 1999. Datos obtenidos de la tabla #6.

# Grafica #5. Índice de Rao y Prabhavathi para hierro absorbido



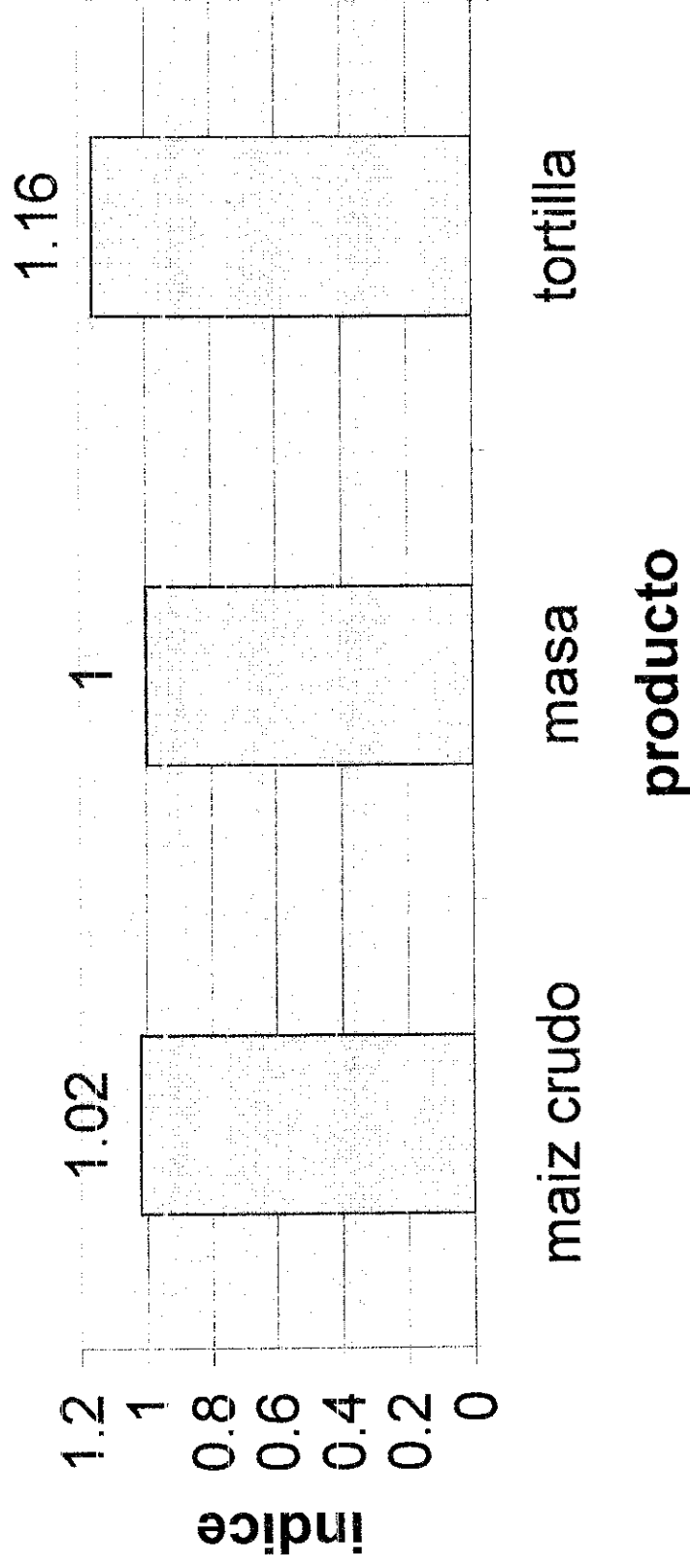
Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo de 1999. Datos provenientes de la tabla #6.

## Grafica #6. Eficiencia de regeneracion de hemoglobina (HRE)



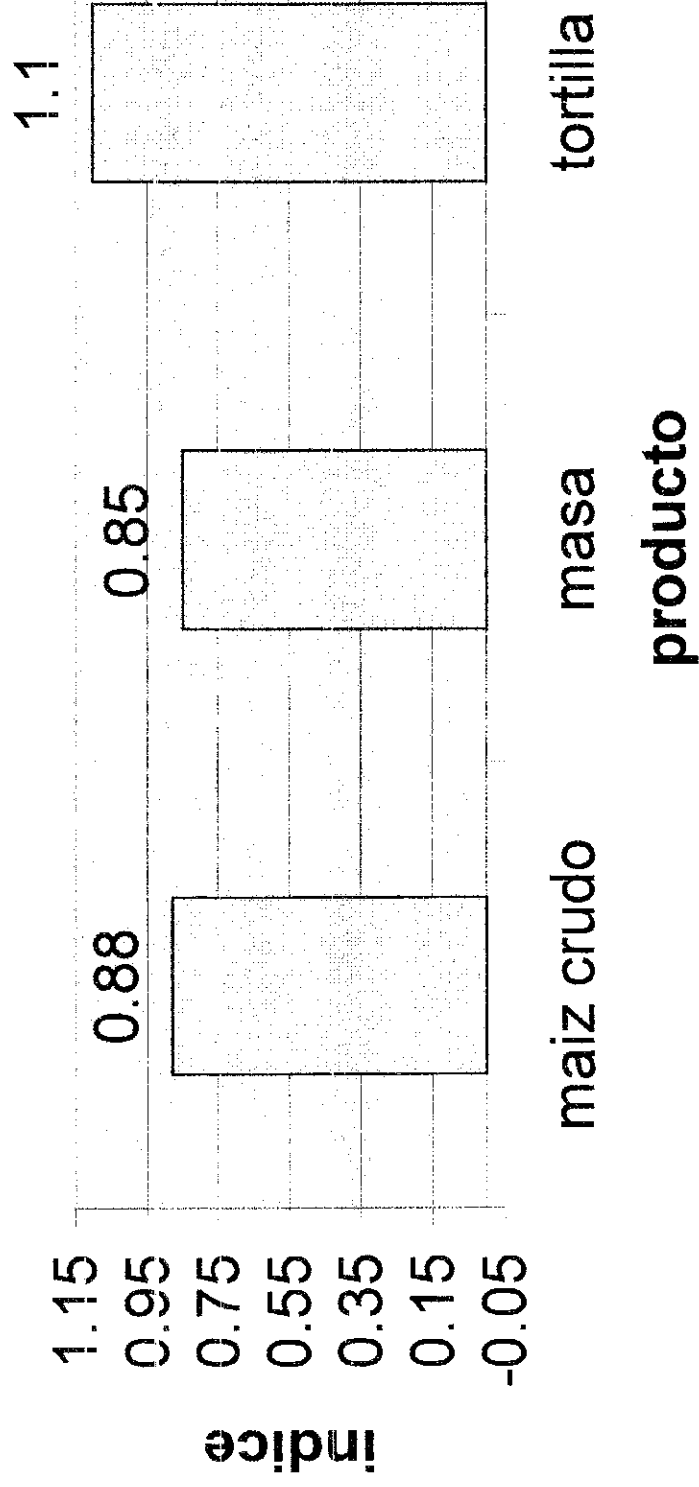
Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo, 1999. Datos obtenidos de la tabla # 14. Allí pueden observarse también los cálculos realizados para obtener dicho índice.

## Grafica #7. Hierro disponible para regeneracion de hemoglobina

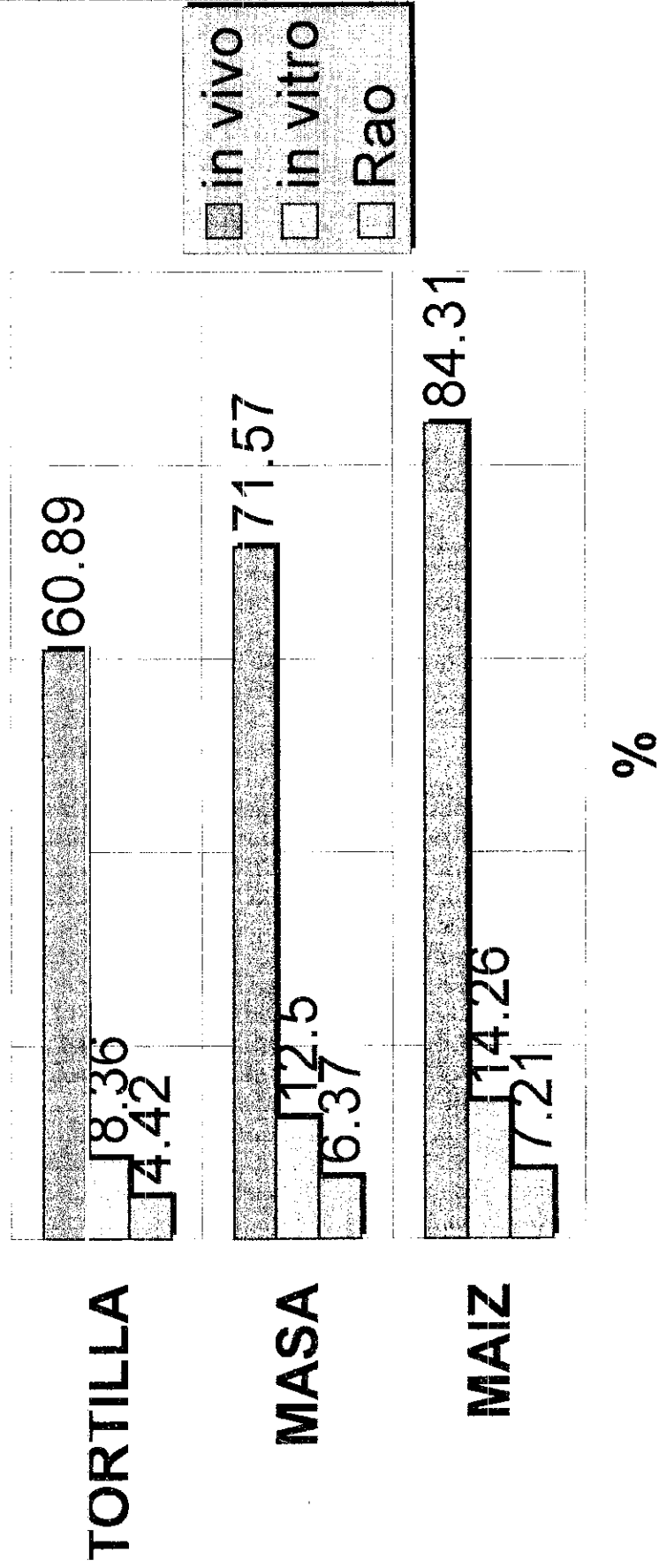


Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo, 1999. Datos obtenidos de la tabla #15, así como los cálculos realizados para obtener el índice, que tiene dimensionales mgFe/100g de dieta.

## Grafica #8. Hierro disponible para uso biologico *in vivo*



# Grafica #9. Comparacion entre indices de disponibilidad de hierro in vivo, in vitro y Rao y Phabhavathi



Fuente: UVG/INCAP, enero-marzo de 1999, datos obtenidos de las tablas #6 y #14.

## VII. CONCLUSIONES

1. El análisis del ácido fítico mostró que la cocción húmeda alcalina del maíz crudo, en la transformación a masa y luego a tortilla, tiene el efecto de disminuir el valor del ácido fítico en un 29% de maíz crudo a masa y a tortilla.
2. Los resultados de disponibilidad in vitro del hierro proveniente del maíz no fueron significativamente diferentes para las muestras de maíz crudo, masa y tortillas; los resultados muestran una tendencia clara que indica que la biodisponibilidad disminuye con el proceso de nixtamalización y cocción de la tortilla.
3. Los resultados de biodisponibilidad in vivo del hierro del maíz (ensayo biológico con ratas) mostraron que no hubo una diferencia significativa entre la biodisponibilidad del hierro del maíz crudo (84.31%), masa (71.57%) y tortilla (60.89%), ya que las diferencias eran muy pequeñas comparadas con las grandes varianzas presentadas y con el hecho de tener grupos de ratas muy pequeños.
4. No se encontró experimentalmente un patrón estadístico entre la ingesta de hierro, la ganancia o pérdida de hemoglobina en sangre y el nivel de hierro en el hígado de las ratas estudiadas.
5. Los resultados generales de este estudio muestran que la biodisponibilidad del hierro del maíz no aumenta significativamente sólo por el descenso del nivel del ácido fítico, y pareciera ser que la biodisponibilidad disminuye; sin embargo los resultados no tienen la suficiente significancia estadística como para invalidar las hipótesis planteadas, por lo que se procederá a realizar una serie de recomendaciones para una posterior realización de un estudio similar que contemple todos estos aspectos que puedan llevar a una validación o invalidación de dichas hipótesis.

6. Se concluye con que los siguientes factores pudieron afectar los resultados de las pruebas *in vivo* e *in vitro*:
- Contaminación de las muestras con hierro de otra fuente externa al maíz
  - Homogenización de las dietas experimentales
  - Alimentación limitada de las ratas y no de la forma *ad libitum*
  - Depleción prolongada de los especímenes en estudio
  - Tamaño de la muestra (se utilizó una cantidad pequeña de ratas en cada grupo experimental.)
  - No se controlaron los niveles de otros factores como el calcio y la fibra que también interfieren con la biodisponibilidad del hierro.
7. Se piensa que los resultados obtenidos pudieron ser diferentes a los esperados ya que sólo se controló al ácido fítico como factor quelante del hierro, aunque puede ser que algún otro factor como el calcio y la fibra interfieran de una forma más importante, pero éstos no fueron controlados.

## VIII. RECOMENDACIONES

Como se mencionó al inicio de este informe, los resultados sobre la biodisponibilidad del hierro en el maíz, y cómo cocinar dicho maíz afecta directamente la biodisponibilidad, son de suma importancia para futuros proyectos de fortificación de harinas de maíz con hierro. Debido a que los resultados obtenidos de este proyecto de investigación no son concluyentes respecto de las hipótesis planteadas, se sugiere una futura realización de este experimento nuevamente, pero ahora tomando en cuenta las recomendaciones que se plantean a continuación:

1. Evitar la contaminación de cualquier muestra, reactivo o equipo con alguna fuente externa de hierro que pueda posteriormente afectar los resultados. En el caso de la preparación de muestras, debe utilizarse agua destilada-desionizada en todo momento desde la cocción húmeda hasta la producción de tortillas; además debe procurarse utilizar un molino de acero inoxidable, de viento o de piedra para la molienda del maíz, no de hierro colado. Es recomendable cocinar las tortillas en un comal de acero inoxidable, teflón o una plancha que no desprenda hierro en cualquier forma. Si se presenta alguna contaminación, ésta afectará tanto los resultados del ensayo *in vivo* como los del ensayo *in vitro*, ya que el primer paso antes de iniciar cualquier ensayo es la preparación de las muestras, paso que es general para ambos ensayos.
2. Debe encontrarse una forma adecuada de la homogenización de las dietas experimentales; se sugiere primeramente que todos los ingredientes de la dieta, incluyendo los productos de maíz tengan la granulometría más fina que se pueda de tal forma evitar sedimentación de algún ingrediente por tener un peso o tamaño mayor. Se sugiere además que la mezcla se realice con algún dispositivo como una batidora industrial o casera y no con la mano, ya que la batidora puede dejarse mezclando por lo menos una hora, lo cual garantizará una mejor mezcla de los ingredientes.

3. La alimentación de los animales de laboratorio, para este tipo de estudios, debe hacerse de forma *ad libitum*, ya que se trata de que el organismo del animal responda de la forma en la que lo haría normalmente, y si se limita la ingesta alimenticia se está obligando al organismo a trabajar en un estado fuera de lo normal. El término *ad libitum*, implica proveer al animal de suficiente alimento en el comedero de tal forma que esté disponible todo el tiempo que el animal lo requiera.
4. Debe evitarse una depleción prolongada de los especímenes de laboratorio; se sugiere que se inicie con una depleción previa de las madres de donde se obtendrá la colonia de ratas para el estudio, de tal forma que las crías provenientes de dichas madres nazcan con valores de hierro orgánico ya disminuidos, y posteriormente la colonia sea sometida a una dieta de depleción libre de hierro (incluyendo sólidos y líquidos). Una depleción prolongada hace que los animales ya no estén en una edad apropiada para el estudio, además que su organismo ha estado expuesto a un shock prolongado que puede causar daños irreversibles.
5. Para la base estadística de dicho estudio debe tomarse en cuenta, dentro de la capacidad de recurso que se tiene, que el número de ratas en cada grupo con dietas experimentales debe ser el mayor posible para poder tener una suficiente evidencia estadística que respalde los resultados obtenidos. Se sugiere tener por lo menos de 8 a 10 animales por cada grupo experimental, además de mantener el balance entre macho y hembras.
6. Debe montarse una batería de ensayos *in vitro* de alta confiabilidad, especialmente para el hierro ionizable, ya que por ser estos valores tan pequeños, cualquier error debido al método puede afectar significativamente los resultados.
7. Para estudios futuros es necesario contemplar el análisis de fibra y calcio al igual que el ácido fítico, puesto que la biodisponibilidad del hierro también está afectada por

estos factores, los cuales no se tomaron en cuenta en el presente estudio. Se sugiere hacer un análisis del calcio y fibra en maíz crudo, masa y tortilla tal y como se hizo con el ácido fítico, para utilizar también estos resultados como control.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Amine, E., R. Neff & M. Hegsted. 1972. *Biological estimation of available iron using chicks or rats*. Journal of Agr. Food Chemistry. Vol. 20, No.2. p. 246
2. AOAC. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC. 14<sup>th</sup> Ed. USA. Pp. 1141
3. Benito, P., House, W. & D. Miller. 1997. Influence of meal frequency on iron absorption as assessed by hemoglobin repletion in rats. TEKTRAN. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service.
4. Bowker, A. & G. Lieberman. 1972. Engineering Statistics. 2<sup>nd</sup> Edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA. p.641.
5. Bressani, et al. 1958. *Chemical changes in corn during preparation of tortillas*. J. Agr. Food Chem. 6: 770-774.
6. Bressani, R. 1990. *Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas*. Food Revs. Intl. 6:225-264.
7. Cochran, W. & G. Cox. 1985. Diseños experimentales. Editorial Trillas. Mexico. p. 661.
8. Gamez Duch, F. *Producción industrial, mercadeo y distribución de harinas de tortilla en Centro América*. En: Bressani, et al.1972. Mejoramiento Nutricional del Maíz. Pp. 165-171. INCAP, Guatemala.
9. Garcia Lopez, S & K. Lee. 1985. *Iron binding by fiber is influenced by competing minerals*. Journal of food science. Vol. 50. p. 424
10. Harper, H. 1975. Review of physiological chemistry. 15<sup>th</sup> Edition. Lange Medical Publications. USA. p. 570.
11. Ifon, E.T. 1981. *Bioavailability to rats of the iron contents in selected cereals*. Nutritional Rep. Int. 24:25.
12. INCAP. 1969. Evaluación Nutricional de la Población de Centro América y Panamá. Guatemala.
13. Instituto Nacional de Estadística. 1991. Encuesta Nacional Aparente de Alimentos 1991. Secretaría General de Planificación Económica. Guatemala.
14. J. Fritz et al. 1970. *Biological availability in animals of iron common dietary sources*. Journal of Agr. Food Chemistry. Vol. 18. No.4. p. 647.
15. J. Miller. 1977. *Availability of iron in several commercial bakery products for hemoglobin regeneration in anemic rats*. Cereal Chemistry. 54(3):572-79.
16. Kaplan, L. & A. Pesce. 1984. Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation. The C.V. Mosby Company. Missouri, USA. Pp. 613-637.

17. Martinez-Torres, et al. 1987. *Iron absorption from maize bread*. Food and Nutrition Bull. 9:60-62.
18. N. Rao & T. Prabhavathi. 1978. *An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods*. The American Journal of Clinical Nutrition. 31:Jan 1978. Pp. 169-175.
19. Paredes-Lopez & M. Saharopoulos. 1982. *Scanning electron microscopy studies of limed corn kernels for tortilla making*. J. Food Technol. 17:687-693.
20. Reinhold, et al. 1981. *Binding of iron fiber of wheat and maize*. Amer. J. Clin. Nutr. 34: 1384-1391.
21. Reinhold, J. & J.S. Garcia-Lopez. 1979. *Fiber of the maize tortilla*. Amer. J. Clin. Nutr. 32: 1326-1329.
22. Zhang, D. et al. 1985. *Bioavailability of iron in green peas, spinach, bran cereal and cornmeal fed to anemic rats*. Journal of food science. Vol 50. p. 426.

## SECCIÓN DE APENDICES

### APENDICE A

Reporte de pesos de las 104 ratas que iniciaron el proceso de depleción

		16-oct	23-oct	30-oct	6-nov	13-nov	20-nov	30-nov	4-dic	Ratas
		(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	Que
rata	Sexo	peso1	peso2	peso3	peso4	Peso5	peso6	peso7	peso8	Murieron
1	Macho	50	82	128	137	200	246	272	<b>279</b>	
2	Macho	52	90	133	145	208	246	264	<b>265</b>	
3	Macho	52	89	125	137	209	236	258	<b>258</b>	
4	Macho	48	81	129	136	203	236	250	<b>252</b>	
5	Macho	50	87	120	140	206	245	271	<b>274</b>	
6	Macho	52	90	120	131	167	218	250	<b>248</b>	Murió
7	Macho	50	82	112	111	160	208	236	<b>242</b>	
8	macho	48	80	85	<b>Murió</b>					Murió
9	macho	50	86	105	108	178	210	221	<b>221</b>	
10	macho	50	88	107	116	191	246	263	<b>255</b>	Murió
11	macho	50	89	130	137	185	228	248	<b>253</b>	
12	macho	52	89	143	146	213	250	258	<b>257</b>	
13	macho	52	91	130	143	216	250	259	<b>260</b>	
14	macho	51	91	110	119	182	223	235	<b>236</b>	Murió
15	macho	51	86	105	117	189	233	247	<b>252</b>	
16	macho	46	85	134	143	219	263	275	<b>276</b>	
17	macho	48	84	120	116	177	201	218	<b>221</b>	
18	macho	48	84	113	117	183	228	243	<b>247</b>	
19	Macho	50	92	116	137	213	251	265	<b>263</b>	
20	Macho	48	84	112	112	189	230	243	<b>240</b>	
21	Macho	42	87	135	140	213	253	265	<b>263</b>	
22	macho	42	82	116	132	207	241	242	<b>240</b>	
23	macho	42	85	104	121	199	238	260	<b>261</b>	
24	macho	46	88	126	145	229	271	296	<b>292</b>	
25	macho	45	87	127	132	194	240	256	<b>259</b>	
26	macho	48	90	110	128	202	247	274	<b>276</b>	
27	macho	46	84	104	112	176	217	233	<b>232</b>	
28	macho	46	86	105	110	176	229	250	<b>253</b>	
29	macho	47	86	104	85	134	189	218	<b>215</b>	
30	macho	46	85	108	130	200	237	263	<b>265</b>	
31	macho	52	94	121	141	197	248	270	<b>272</b>	
32	macho	52	92	103	<b>Murió</b>					Murió
33	macho	47	88	93	104	175	214	241	<b>243</b>	
34	macho	51	85	105	132	207	245	271	<b>275</b>	
35	macho	52	84	116	98	169	209	242	<b>241</b>	
36	macho	53	93	100	105	170	213	245	<b>246</b>	
37	macho	52	85	104	<b>Murió</b>					Murió
38	macho	40	76	120	134	198	241	265	<b>262</b>	

39	macho	40	79	88	102	170	216	233	<b>237</b>	
40	macho	39	77	96	82	145	188	208	<b>195</b>	
41	macho	50	85	92	113	181	218	220	<b>212</b>	
42	macho	51	94	111	100	167	215	229	<b>226</b>	
43	macho	55	98	120	140	208	250	265	<b>263</b>	
44	macho	53	92	112	122	195	243	274	<b>273</b>	
45	macho	55	91	114	94	156	219	255	<b>255</b>	
46	macho	54	94	107	98	174	226	250	<b>248</b>	
47	macho	54	89	114	118	186	224	248	<b>248</b>	
48	macho	55	96	116	131	215	250	276	<b>275</b>	
49	macho	38	64	96	130	152	194	229	<b>226</b>	
50	macho	36	73	109	137	200	243	260	<b>258</b>	
51	hembra	44	76	113	116	164	187	196	<b>191</b>	Murió
52	hembra	50	81	119	133	167	193	202	<b>204</b>	
53	hembra	48	83	121	134	173	193	201	<b>199</b>	
54	hembra	48	74	114	141	167	193	197	<b>186</b>	Murió
55	hembra	48	86	122	139	187	215	217	<b>222</b>	
56	hembra	39	74	90	125	167	198	205	<b>209</b>	
57	hembra	48	78	115	139	168	189	191	<b>190</b>	
58	hembra	49	87	112	148	175	199	199	<b>206</b>	
59	hembra	48	81	118	141	168	188	193	<b>197</b>	
60	hembra	51	82	103	132	170	187	199	<b>200</b>	
61	hembra	45	80	87	121	146	163	167	<b>162</b>	Murió
62	hembra	40	57	80	126	165	193	197	<b>198</b>	Murió
63	hembra	39	65	70	86	136	156	157	<b>145</b>	Murió
64	hembra	39	70	114	142	173	207	212	<b>215</b>	
65	hembra	50	80	84	109	159	182	188	<b>190</b>	
66	hembra	52	62	83	118	157	180	194	<b>192</b>	
67	hembra	40	60	103	116	155	176	178	<b>172</b>	
68	hembra	49	72	115	124	169	183	190	<b>187</b>	Murió
69	hembra	49	85	112	140	182	203	204	<b>215</b>	
70	hembra	50	86	100	135	173	194	202	<b>206</b>	Murió
71	hembra	39	78	101	111	151	169	176	<b>184</b>	
72	hembra	42	80	100	122	170	200	206	<b>205</b>	
73	hembra	50	74	92	100	134	144	150	<b>151</b>	
74	hembra	52	90	115	121	179	211	226	<b>229</b>	
75	hembra	47	88	93	99	153	190	206	<b>204</b>	
76	hembra	51	83	75	<b>murió</b>					Murió
77	hembra	42	75	104	108	154	182	198	<b>198</b>	
78	hembra	50	90	125	142	184	201	217	<b>216</b>	
79	hembra	51	86	121	145	174	188	189	<b>187</b>	
80	hembra	44	80	103	127	171	198	214	<b>215</b>	
81	hembra	52	84	111	134	179	211	216	<b>218</b>	
82	hembra	50	82	98	120	166	196	196	<b>199</b>	
83	hembra	48	76	115	120	165	182	204	<b>209</b>	
84	hembra	49	85	104	119	167	187	206	<b>212</b>	
85	hembra	50	93	106	121	176	210	228	<b>230</b>	

86	hembra	45	82	91	<b>Murió</b>					Murió
87	hembra	42	80	74	<b>Murió</b>					Murió
88	hembra	53	74	112	115	166	173	192	<b>198</b>	
89	hembra	52	81	112	119	167	190	202	<b>203</b>	
90	hembra	52	80	112	141	169	187	194	<b>194</b>	
91	hembra	42	78	119	128	184	203	212	<b>211</b>	
92	hembra	52	81	111	119	163	180	184	<b>185</b>	
93	hembra	53	85	114	115	165	187	200	<b>200</b>	
94	hembra	43	84	121	131	181	215	230	<b>233</b>	
95	hembra	39	78	102	116	166	188	199	<b>200</b>	
96	hembra	43	81	112	95	148	168	188	<b>190</b>	
97	hembra	48	84	110	143	171	193	214	<b>216</b>	Murió
98	hembra	51	90	127	120	172	182	180	<b>168</b>	Murió
99	hembra	49	85	112	<b>Murió</b>					Murió
100	hembra	47	82	115	137	167	185	200	<b>200</b>	
101	hembra	56	81	101	141	172	190	198	<b>196</b>	
102	hembra	55	85	89	114	162	183	190	<b>189</b>	
103	hembra	56	90	102	141	190	210	214	<b>215</b>	
104	hembra	55	89	112	139	174	197	208	<b>215</b>	

**APENDICE B**

Muestras de sangre realizadas durante la etapa de depleción

<b>DATOS Y RESULTADOS DEL SANGRADO DE RATAS (16 Oct) #1</b>					
	<b>rata #</b>	<b>Replica</b>	<b>Abs</b>	<b>g/dL</b>	<b>Media g/dL</b>
	1	A	0.374	13.80	13.94
		B	0.382	14.08	
	10	A	0.235	8.60	8.60
		B	<i>no hay</i>	<i>no hay</i>	
	20	A	0.266	9.70	10.10
		B	0.284	10.50	
	30	A	0.321	11.80	11.39
		B	0.297	10.98	
	40	A	0.321	11.84	11.27
		B	0.290	10.70	
	50	A	0.220	8.10	8.10
		B	<i>no hay</i>	<i>no hay</i>	
	60	A	0.367	13.48	12.89
		B	0.335	12.30	
	70	A	0.339	12.50	12.36
		B	0.333	12.22	
	80	A	0.314	11.60	10.87
		B	0.276	10.14	
	90	A	0.340	12.50	11.74
		B	0.297	10.98	
	100	A	<i>no hay</i>	<i>no hay</i>	<i>no hay</i>
		B	<i>no hay</i>	<i>no hay</i>	<i>no hay</i>
				<b>Promedio</b>	<b>11.1</b>

<b>DATOS Y RESULTADOS DEL SANGRADO DE RATAS (NOV.13)</b>						
Hb = hem	Oglobina					
<b>Orden</b>	<b>Rata #</b>	<b>ABS 1</b>	<b>ABS 2</b>	<b>Hb 1</b>	<b>Hb 2</b>	<b>Hb X</b>
1	3	0.202	0.212	7.4	7.8	7.6
2	7	0.276	0.318	10.2	11.7	10.9
3	13	0.226	0.228	8.3	8.4	8.4
4	17	0.292	0.265	10.7	9.8	10.2
5	23	0.224	0.193	8.2	7.1	7.7
6	27	0.194	0.185	7.1	6.8	7.0
7	33	0.219	0.208	8.1	7.7	7.9

8	36	0.279	0.252	10.3	9.3	<b>9.8</b>
9	43	0.237	0.244	8.7	9.0	<b>8.9</b>
10	47	0.283	0.314	10.4	11.6	<b>11.0</b>
11	53	0.384	0.392	14.1	14.4	<b>14.3</b>
12	57	0.252	0.239	9.3	8.8	<b>9.0</b>
13	63	0.240	0.216	8.8	7.9	<b>8.4</b>
14	67	0.254	0.243	9.3	8.9	<b>9.1</b>
15	73	0.300	0.334	11.0	12.3	<b>11.7</b>
16	77	0.236	0.231	8.7	8.5	<b>8.6</b>
17	83	0.213	0.269	7.8	9.9	<b>8.9</b>
18	88	0.310	0.300	11.4	11.0	<b>11.2</b>
19	93	0.274	0.280	10.1	10.3	<b>10.2</b>
20	97	0.276	0.274	10.2	10.1	<b>10.1</b>
21	103	0.267	0.248	9.8	9.1	<b>9.5</b>
Ultimo valor promedio= <b>11.1</b>					<b>PROMEDIO=</b>	<b>9.5</b>
(Oct 16)					(Nov 13)	
					<b>Des.Std.(n) =</b>	<b>1.64</b>
					<b>Des.Std.(n-1)=</b>	<b>1.68</b>

<b>DATOS Y RESULTADOS DEL SANGRADO DE RATAS (NOV. 20)</b>						
<b>orden</b>	<b>Rata #</b>	<b>ABS 1</b>	<b>AES 2</b>	<b>Hb 1</b>	<b>Hb 2</b>	<b>Hb X</b>
1	2	0.255	0.278	9.4	10.2	<b>9.8</b>
2	5	0.186		6.8		<b>6.8</b>
3	9	0.227	0.217	8.4	8.0	<b>8.2</b>
4	16	0.187	0.187	6.9	6.9	<b>6.9</b>
5	40	0.267	0.283	9.8	10.4	<b>10.1</b>
6	42	0.255	0.250	9.4	9.2	<b>9.3</b>
7	51	0.239	0.250	8.8	9.2	<b>9.0</b>
8	55	0.262	0.289	9.6	10.6	<b>10.1</b>
9	69	0.288	0.343	10.6	12.6	<b>11.6</b>
10	71	0.244	0.276	9.0	10.2	<b>9.6</b>
11	92	0.281	0.271	10.3	10.0	<b>10.2</b>
Ultimo valor promedio= <b>9.5</b>					<b>PROMEDIO=</b>	<b>9.2</b>
(Nov.13)					(Nov 13)	
					<b>Des.Std.(n) =</b>	<b>1.38</b>
					<b>Des.Std(n-1)=</b>	<b>1.44</b>

<b>DATOS Y RESULTADOS DEL SANGRADO DE RATAS (DIC. 2)</b>						
orden	Rata #	ABS 1	ABS 2	Hb 1	Hb 2	Hb X
1	19	0.295	0.296	10.9	10.9	10.9
2	12	0.240	0.237	8.8	8.7	8.8
3	22	0.248	0.244	9.1	9.0	9.1
4	29	0.314	0.322	11.6	11.8	11.7
5	48	0.282	0.285	10.4	10.5	10.4
6	52	0.296	0.303	10.9	11.2	11.0
7	62	0.277	0.273	10.2	10.0	10.1
8	72	0.272	0.279	10.0	10.3	10.1
9	85	0.280	0.282	10.3	10.4	10.3
10	98	0.313	0.320	11.5	11.8	11.6
Ultimo valor promedio= <b>9.2</b>					<b>PROMEDIO=</b>	<b>10.4</b>
(Nov.20)					(Nov 13)	
					<b>Des.Std.(n) =</b>	<b>0.9</b>
					<b>Des.Std(n-1)=</b>	<b>0.95</b>

<b>DATOS Y RESULTADOS DEL SANGRADO DE RATAS (DIC. 14)</b>						
orden	Rata #	ABS 1	ABS 2	Hb 1	Hb 2	Hb X
1	7	0.291	0.291	10.7	10.7	10.7
2	33	0.234	0.238	8.6	8.8	8.7
3	53	0.331	0.315	12.2	11.6	11.9
4	103	0.240	0.234	8.8	8.6	8.7
5	40	0.233	0.275	8.6	10.1	9.3
6	2	0.269	0.284	9.9	10.5	10.2
7	69	0.282	0.273	10.4	10.0	10.2
8	71	0.226	0.224	8.3	8.2	8.3
9	19	0.280	0.258	10.3	9.5	9.9
10	29	0.262	0.257	9.6	9.5	9.5
11	98	0.323	0.316	11.9	11.6	11.8
12	62	0.284	0.294	10.5	10.8	10.6
Ultimo valor promedio= <b>10.4</b>					<b>PROMEDIO=</b>	<b>10.0</b>
(Dic. 2)					(Nov 13)	
					<b>Des.Std.(n) =</b>	
					<b>Des.Std(n-1)=</b>	

### APENDICE C

Peso inicial y final, Hemoglobina inicial y final, ganancia de peso y Hb en las 40 ratas que ingresaron al estudio

	Código	# rata	(g/dL) Hb inic	(g/dL) Hb final	(g/dL) dif Hb	(g) peso in	(g) peso fin	(mg Fe) Hierro ganado
<b>MAIZ</b>	<b>A1</b>	3	7.2	10.9	3.7	260	326	<b>3.77</b>
<b>CRUDO</b>	<b>A2</b>	13	11.0	10.5	-0.5	249	309	<b>1.13</b>
<b>62.50%</b>	<b>A3</b>	58	11.2	10.8	-0.4	171	242	<b>1.57</b>
	<b>A4</b>	60	11.3	12.7	1.4	157	220	<b>2.29</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.2</b>	<b>11.2</b>	<b>1.1</b>			<b>2.19</b>
	<b>B1</b>	29	11.0	11.6	0.6	238	316	<b>2.35</b>
<b>MAIZ</b>	<b>B2</b>	49	7.2	9.6	2.4	219	296	<b>2.84</b>
<b>CRUDO</b>	<b>B3</b>	85	11.2	13.6	2.4	250	359	<b>4.67</b>
<b>75%</b>	<b>B4</b>	104	10.7	12.3	1.6	198	259	<b>2.40</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.0</b>	<b>11.3</b>	<b>1.8</b>			<b>3.06</b>
<b>MASA</b>	<b>C1</b>	2	10.9	11.0	0.1	248	321	<b>1.86</b>
<b>62.50%</b>	<b>C2</b>	17	7.9	11.1	3.2	228	298	<b>3.38</b>
	<b>C3</b>	72	10.4	9.1	-1.3	171	232	<b>0.75</b>
	<b>C4</b>	66	11.4	11.1	-0.3	162	227	<b>1.51</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.2</b>	<b>10.3</b>	<b>0.4</b>			<b>1.87</b>
<b>MASA</b>	<b>D1</b>	16	10.7	11.2	0.5	293	363	<b>2.09</b>
<b>75%</b>	<b>D2</b>	44	8.3	9.5	1.2	239	334	<b>2.67</b>
	<b>D3</b>	83	11.0	8.8	-2.2	202	258	<b>0.11</b>
	<b>D4</b>	94	10.7	7.7	-3.0	241	294	<b>-0.71</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.2</b>	<b>9.3</b>				<b>1.04</b>
<b>TORT.</b>	<b>E1</b>	34	9.2	9.9	0.7	273	377	<b>2.74</b>
<b>62.50%</b>	<b>E2</b>	42	10.3	12.5	2.2	210	341	<b>4.71</b>
	<b>E3</b>	52	9.9	9.7	-0.2	201	262	<b>1.24</b>
	<b>E4</b>	84	11.4	9.9	-1.5	196	251	<b>0.56</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.2</b>	<b>10.5</b>	<b>0.3</b>			<b>2.31</b>
<b>TORT.</b>	<b>F1</b>	22	9.9	6.8	-3.1	232	299	<b>-0.59</b>
<b>75%</b>	<b>F2</b>	33	9.6	11.3	2.0	264	339	<b>3.14</b>
	<b>F3</b>	67	11.6	13.2	1.6	182	240	<b>2.37</b>
	<b>F4</b>	101	9.7	9.7	0.0	196	224	<b>0.61</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.2</b>	<b>10.3</b>				<b>1.38</b>
<b>curva 0</b>	<b>G1</b>	12	9.2	10.3	1.1	251	300	<b>1.75</b>
	<b>G2</b>	21	10.7	9.4	-1.3	267	321	<b>0.36</b>
	<b>G3</b>	77	9.7	9.0	-0.7	179	223	<b>0.61</b>
	<b>G4</b>	102	11.6	12.0	0.4	183	221	<b>1.19</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.3</b>	<b>10.2</b>	<b>-0.1</b>			<b>0.98</b>
<b>curva 5</b>	<b>H1</b>	11	10.3	11.8	1.5	267	318	<b>2.25</b>
	<b>H2</b>	27	9.6	9.2	-0.4	229	284	<b>0.93</b>
	<b>H3</b>	79	11.6	12.9	1.3	206	225	<b>1.15</b>
	<b>H4</b>	103	9.6	11.4	1.8	177	233	<b>2.15</b>
	<b>promedios</b>		<b>10.3</b>	<b>11.3</b>	<b>1.1</b>			<b>1.62</b>

			(g/dL)	(g/dL)	(g/dL)	(g)	(g)	(mg Fe)
	Código	# rata	Hb inic	Hb final	dif Hb	peso in	peso fin	difer. Fe
<b>Curva 10</b>	I1	35	10.1	11.2	1.1	254	297	1.71
	I2	40	9.9	11.8	1.9	180	235	2.22
	I3	69	9.8	12.5	2.7	167	229	2.75
	I4	92	11.4	14.3	2.9	162	216	2.79
	<b>promedios</b>			<b>10.3</b>	<b>12.5</b>	<b>2.2</b>		
<b>Curva 15</b>	J1	46	9.9	12.5	2.6	262	323	3.24
	J2	50	10.3	13.3	3.0	246	316	3.75
	J3	57	12.0	14.0	2.0	195	242	2.35
	J4	71	8.1	10.5	2.4	211	238	1.77
	<b>promedios</b>			<b>10.1</b>	<b>12.5</b>	<b>2.5</b>		

## APENDICE D

### 1. Valores de HRE (índice de biodisponibilidad 1) individuales para las ratas del ensayo in vivo

Rata	mgFe ganados Hb	mgFe dados	HRE (%)
A2	1.13	2.2345	50.57
A3	1.57	2.2345	70.26
A4	2.29	2.2345	102.48
B1	2.35	2.6855	87.51
B2	2.84	2.6855	105.75
B4	2.40	2.6855	89.36
C1	1.86	2.5625	72.58
C4	1.51	2.5625	58.93
D1	2.09	3.075	67.96
D2	2.67	3.075	86.82
E1	2.74	3.526	77.71
E3	1.24	3.526	35.17
F2	3.14	4.223	74.35
F3	2.37	4.223	56.12

### 2. Valores para el Índice 2 individual de las ratas del ensayo in vivo

Rata	mgFe ganados/mgFe dados	mgFe/100g dieta	INDICE 2
A2	0.5057	1.09	0.5512
A3	0.7026	1.09	0.7658
A4	1.0248	1.09	0.1170
B1	0.8751	1.31	1.1463
B2	1.0575	1.31	1.3854
B4	0.8936	1.31	1.1707
C1	0.7258	1.25	0.9073
C4	0.5893	1.25	0.7854
D1	0.6796	1.50	1.0195
D2	0.8682	1.50	1.3024
E1	0.7771	1.72	1.3366
E3	0.3517	1.72	0.6049
F2	0.7435	2.06	1.5317
F3	0.5612	2.06	1.1561

### 3. Valores para el índice 3 individual de las ratas del ensayo in vivo

Rata	Valor Biológico Relativo	mgFe/100g dieta	INDICE 3
A2	0.085	1.09	0.0927
A3	0.4117	1.09	0.4488
A4	0.9487	1.09	1.0342
B1	0.8341	1.31	1.0926
B2	1.1320	1.31	1.4830
B4	0.8601	1.31	1.1269
C1	0.5502	1.25	0.6878
C4	0.3863	1.25	0.4830
D1	0.5821	1.50	0.8732
D2	0.8943	1.50	1.3415
E1	0.8139	1.72	1.3999
E3	0.1077	1.72	0.1854
F2	0.8382	2.06	1.7269
F3	0.5351	2.06	1.1026

**APENDICE E****Base de datos sobre los valores de ácido fítico, hierro total, hierro ionizable****1. Acido fítico**

Curva de calibración con estándares de ácido fítico

#	UgFF/mL	ABS
0	0	1.170
2	5.3392	1.020
4	10.6785	0.932
6	16.0177	---
8	21.3569	0.640
10	26.6961	0.550
12	32.0354	0.424

$$Y = -0.0232X + 1.1611$$

$$R^2 = 0.9966$$

#	Muestra	Peso g	ABS	ugFF/ml	mgFF/g	gAF/100g	Media	Desv.	MgAF/100g
1	Maíz crudo	0.2059	0.843	13.7112	1.9977	0.7135			
2	Maíz crudo	0.2063	0.830	14.2716	2.0754	0.7412	0.7273	0.0196	727.34
3	Masa	0.2056	0.918	10.4784	1.5290	0.5461			
4	Masa	0.2072	0.920	10.3922	1.5047	0.5374	0.5417	0.0061	541.72
5	Tortilla	0.2045	0.928	10.0474	1.4739	0.5264			
6	Tortilla	0.2035	0.938	9.6164	1.4176	0.5063	0.5164	0.0142	516.36

**2. Hierro total**

Muestra	Ppm hierro	Peso	mgFe/g muestra	Media (mgFe/g)
Maíz crudo	1.4	2.00	0.0175	
Maíz crudo	1.4	2.00	0.0175	0.0175
Masa	1.7	2.00	0.0212	
Masa	1.5	2.00	0.0187	0.0200
Tortilla	2.2	2.00	0.0275	
Tortilla	2.2	2.00	0.0275	0.0275

La calibración con los estándares de hierro se hace directamente en el aparato de absorción atómica, el aparato calcula automáticamente la curva de calibración y provee los resultados expresados ya en ppm de hierro.

### 3. Hierro ionizable

Curva de calibración con estándares de hierro

#	ppm de hierro	ABS
1	0.032	0.005
2	0.064	0.008
3	0.096	0.012
4	0.128	0.016
5	0.16	0.021
6	0.192	0.024
7	0.32	0.042

$$Y = 0.1298X - 0.00011$$

$$r = 0.9987$$

Muestra	ABS	ppm Fe	Peso (g)	mgFe/g	Media mgFe/g
M. crudo	0.028	0.2165	2.0006	0.0027	
M. crudo	0.024	0.1857	2.0014	0.0023	0.0025
M. crudo	0.028	0.2165	2.0031	0.0027	
Masa	0.026	0.2011	2.0078	0.0025	
Masa	0.026	0.2011	2.0052	0.0025	0.0025
Masa	0.026	0.2011	2.0018	0.0025	
Tortilla	0.025	0.1934	2.0012	0.0024	
Tortilla	0.022	0.1703	2.0014	0.0021	0.0023
Tortilla	0.024	0.1857	2.0092	0.0023	





**APENDICE G****Análisis estadístico****Diferencia de medias para muestras pequeñas con varianzas grandes para el Índice de Eficiencia de Regeneración de Hemoglobina (% HRE)**

Ho:  $X = Y$  (y para Z también)

H1:  $X \neq Y$  (y para Z también)

**Maíz crudo (incluyendo 62.5% y 75%) X**

Media = 84.32%

Desv. Stnd. = 20.74

Varianza = 432.27

**Masa (incluyendo 62.5% y 75%) Y**

Media = 71.57%

Desv. Stnd. = 11.64

Varianza = 135.46

**Tortillas (incluyendo 62.5% y 75%) Z**

Media = 60.84%

Desv. Stnd. = 19.56

Varianza = 382.78

Comparación de medias	Grados de libertad calculados	t' experimental	t crítico
X y Y	11.55	0.16	2.20
X y Z	10.93	0.20	2.201
Y y Z	8.14	0.11	2.306

**CONCLUSION:** todos los valores de t' experimental caen en el área de aceptación de la Ho, por lo que estadísticamente las medias no son diferentes. Esto se debe principalmente a que los grupos de ratas en cada tratamiento (maíz, masa y tortilla) presentan varianzas muy grandes para un número muy pequeño de muestras.