

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración
de vitamina A en leche materna utilizando un medidor de
vitamina A portátil

Trabajo de investigación presentado
por Stephanie Gabriela Argueta Contreras para optar al grado
académico de
Licenciada en Nutrición

Guatemala
2013

Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración de vitamina A en leche materna utilizando un medidor de vitamina A portátil

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración
de vitamina A en leche materna utilizando un medidor de
vitamina A portátil

Trabajo de investigación presentado por
Stephanie Gabriela Argueta Contreras para optar al grado
académico de
Licenciada en Nutrición

Guatemala

2013

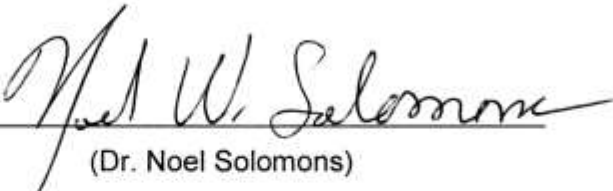
(f) 

(Dra. Mónica Orozco)

Tribunal Examinador:

(f) 

(Lic. Lucia Castellanos)

(f) 

(Dr. Noel Solomons)

(f) 

(Dra. Mónica Orozco)

Fecha de aprobación: Guatemala 25 de Noviembre 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme tantas bendiciones, por mostrarme su poder manifestado en mi vida, y darme la fuerza necesaria para lograr mis metas.

Agradezco a CeSSIAM, a todo el equipo, por acogerme e instruirme, especialmente al Dr. Noel Solomons MD por su apoyo en la realización de este proyecto y por trasmitirme un poquito de su sabiduría.

A mi asesora Mónica Orozco PhD, por estar apoyándome durante cada etapa del trabajo de graduación, por orientarme, explicarme, y especialmente por permitirme ser parte de este proyecto.

Agradezco a mi familia, especialmente a mi mamá por su apoyo, por estar a mi lado, aún en las noches desvelo.

Así mismo a cada una de las madres que voluntariamente participaron donando leche.

Y por último agradezco a Javier Girón por su apoyo, paciencia, ánimo, y a Lucrecia Leb por apoyo incondicional incluyendo la elaboración de este proyecto.

ÍNDICE

| | Páginas |
|--------------------------------------|---------|
| AGRADECIMIENTOS | vi |
| LISTA DE CUADROS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| RESUMEN | xiii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES..... | 3 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 22 |
| IV. OBJETIVOS..... | 22 |
| V. HIPÓTESIS Y VARIABLES | 27 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| VII. RESULTADOS | 44 |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 59 |
| IX. CONCLUSIONES | 64 |
| X. RECOMENDACIONES..... | 65 |
| XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| XII. APÉNDICE | 70 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro. 1 Equivalencia de los compuestos con actividad de vitamina A y sus relacionados. | 9 |
| Cuadro 2. Descripción de las variables estudiadas | 28 |
| Cuadro 3. Recursos físicos, materiales y financieros | 30 |
| Cuadro 3. Descripción de códigos para casa sujeto en la fase piloto | 30 |
| Cuadro 5. Descripción de códigos y aleatorización para cada sujeto y orden de tratamientos a tomar..... | 36 |
| Cuadro 6. Descripción de los tratamientos..... | 37 |
| Cuadro 7. Descripción de madres lactantes (n=6) participantes del estudio para la fase piloto..... | 44 |
| Cuadro 8. Concentraciones de retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de madres lactantes (n=6) participantes de la fase piloto en tratamientos 90 y 120 minutos. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango. | 45 |
| Cuadro 9. Descripción de madres lactantes (n=12) participantes del estudio para la fase definitiva..... | 47 |
| Cuadro 10. Concentraciones de retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango..... | 48 |
| Cuadro 11. Concentraciones de retinol normalizado por el porcentaje de grasa (μgRE por gramo de grasa) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango..... | 49 |
| Cuadro 12. Porcentaje de grasa (g/L) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos | |

| | |
|--|----|
| de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango..... | 50 |
| Cuadro 13. Volúmenes (ml) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango. | 51 |
| Cuadro 14. Valores de retinol (μg /L y μg /g) datos las 4 muestras de azúcar utilizadas para los tratamientos provistos a las madres. Datos son presentados como promedios. | 58 |
| Cuadro 15. Cronograma de trabajo enero 2013 a septiembre 2013..... | 72 |
| Cuadro 16. Pruebas t para cambio de retinol en el tiempo basal e inicial de cada tratamiento, | 88 |
| Cuadro 17. Pruebas t para cambio de retinol normalizado en el tiempo basal e inicial de cada tratamiento. | 89 |
| Cuadro 18. Pruebas t para cambio de grasa en el tiempo basal e inicial de cada tratamiento. | 90 |
| Apéndice 12. Pruebas estadísticas de ANOVA con Medidas Repetidas..... | 93 |
| Cuadro 19. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol inicial..... | 93 |
| Cuadro 20. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol final..... | 93 |
| Cuadro 21. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos cambio retinol..... | 94 |
| Cuadro 22. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol normalizado inicial | 94 |
| Cuadro 23. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol normalizado final..... | 95 |
| Cuadro 24. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos del cambio retinol normalizado | 95 |

| | |
|---|-----|
| Cuadro 25. Pruebas de esfericidad para retinol | 96 |
| Cuadro 26 Pruebas de esfericidad para retinol normalizado | 98 |
| Cuadro 27. Pruebas de medidas repetidas para los datos de retinol | 99 |
| Cuadro 28 Pruebas de medidas repetidas para los datos de retinol normalizado | 101 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Instrumento ICheck™ Fluoro | 19 |
| Figura 2. Fases de medición con instrumento ICheck™ Fluoro | 20 |
| Figura 4. Pasos procedimiento de análisis de porcentaje de Crematocrito y retinol | 41 |
| Figura 5. Porcentaje de cambio de retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de leche materna, post- tratamiento 90 y 120 minutos en la fase piloto. | 45 |
| Figura 6. Porcentaje de cambio de retinol normalizado con el porcentaje de grasa. (μg por gramo de grasa) post tratamiento de madres lactantes participantes en la fase piloto (n=6), Datos presentados en porcentaje , dividido en post-tratamiento 90 minutos y post-tratamiento 120 minutos..... | 46 |
| Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos de estudio. | 52 |
| Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes retinol ($\mu\text{g} / \text{g}$ de grasa) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos de estudio. | 53 |
| Figura 9. Porcentaje de cambio retinol (ug RE/L) entre el basal y el final en las muestras de leche de las madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos. Datos presentados en porcentaje de $\mu\text{g} / \text{L}$ y error estándar. | 54 |
| Figura 10. Porcentaje de cambio retinol (ug RE por gramo de grasa) entre el basal y el final en las muestras de leche de las madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos. Datos presentados en porcentaje de μg por gramo y error estándar..... | 55 |
| Figura 11. Porcentaje de Cambio de gramos de grasa entre el basal y el final en las muestras de leche de las madres (n=12) que | |

| | |
|--|----|
| consumieron los tres tratamientos. Datos presentados en porcentaje de grasa y error estándar..... | 56 |
| Figura 12. Concentración de retinol basal ($\mu\text{g} /\text{L}$) y retinol post-tratamiento ($\mu\text{g} /\text{L}$) de cada madre lactante (n=12) participante del tratamiento de azúcar sin fortificar..... | 57 |
| Figura 13. Concentración de retinol basal ($\mu\text{g} /\text{L}$) y retinol post-tratamiento ($\mu\text{g} /\text{L}$) de cada madre lactante (n=12) participante del tratamiento de azúcar fortificada | 57 |
| Figura 14. Concentración de retinol basal ($\mu\text{g} /\text{L}$) y retinol post-tratamiento ($\mu\text{g} /\text{L}$) de cada madre lactante (n=12) participante del tratamiento de azúcar fortificada más grasa..... | 58 |
| Figura 15. Diagrama de metodología fase piloto | 73 |
| Figura 16.. Diagrama de metodología fase definitiva | 74 |

RESUMEN

Los beneficios de la lactancia materna para los lactantes, así como el impacto directo de la ingesta de vitamina A de la madre y la calidad de la lactancia materna son ampliamente conocidos. (Tanumihardjo, 2002) (Alam, 2010) (Ross, 2003), pero aún es necesario conocer un poco más acerca de la cinética de absorción de la vitamina A y su transferencia a la leche materna. El método más común utilizado para la cuantificación de vitamina A en lactancia materna, es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), este es costoso y difícil de implementar en el campo, por lo que se han desarrollado otras tecnologías como el espectrofluorómetro iCheck™Fluoro, el cual se describe como efectivo y preciso de acuerdo a evidencia de validaciones y estudios realizados. (Schweigert, 2011)(Oliveira, 2010)

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el cambio en la concentración de vitamina A ($\mu\text{g/L}$) en la leche materna madura de doce madres lactantes, después de consumir azúcar fortificada con vitamina A, utilizando el espectrofluorómetro iCheck™Fluoro. También se buscó evaluar si existía una diferencia en la concentración de vitamina A en la leche materna de las madres, al consumir tres tratamientos distintos: azúcar fortificada, azúcar sin fortificar, y azúcar fortificada y grasa.

Antes de realizar esta intervención, se hizo un estudio piloto, en el cual se determinó si existía un incremento detectable en la concentración de vitamina A después del consumo de azúcar fortificada, así como definir el tiempo óptimo en donde ocurría el aumento máximo en la concentración de vitamina A en la leche. Para el muestreo participaron seis madres lactantes, a las cuales se les extrajo una muestra basal de leche de un pecho con por lo menos dos horas de no haber sido succionado y con al menos 8 horas de ayuno. Posteriormente las madres ingirieron una bebida de cereales con 45 g de azúcar Caña Real®, la cual contenía aproximadamente 450 μg y 30 g de crema no láctea Poll® (10 g grasa). Se extrajo la muestra basal a los 90 minutos ($n=3$) y a los 120 minutos ($n=3$). Se determinó que si existe un aumento en la cantidad de vitamina A ($\mu\text{g/L}$) en la leche materna y que el tiempo óptimo para obtener la muestra de leche era de 90 min. post tratamiento debido a que se observaron tendencias de aumento

en este período y fue un lapso de espera más conveniente para las madres en condiciones de ayuno.

Para el estudio de intervención definitivo, a un grupo de doce mujeres lactantes les fue asignado aleatoriamente los tres tratamientos experimentales: bebida de cereales con 45 g de azúcar fortificada ($\approx 450 \mu\text{g}$), bebida de cereales con 45 gramos de azúcar fortificada y 10 g de grasa y bebida de cereales con 45 gramos de azúcar sin fortificar (control). El muestreo se llevó a cabo en las mismas condiciones que el muestreo de la fase definitiva. Se extrajo la muestra basal 90 min. post-tratamiento.

No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de vitamina A ($\mu\text{g RE}$) basal y final de la leche materna en cada uno de los tratamientos. Aunque se pudo observar una tendencia de aumento, al consumir la bebida de cereales con azúcar fortificada y también con azúcar fortificada y grasa. En cuanto a la diferencia en la concentración de vitamina A entre los tratamientos, no se encontró diferencia significativa, pero se observa que al consumir la bebida conteniendo azúcar fortificada se percibe un mayor aumento, que al consumir azúcar fortificada con grasa, mientras que se mantiene o en algunos casos disminuye al consumir el tratamiento de la bebida conteniendo azúcar sin fortificar. Es posible que la falta de cambio significativo observado se deba el tamaño de la muestra ($n=12$) o a que el tiempo de espera 90 minutos post-tratamientos, son insuficientes para observar un aumento considerable. El estudio aunque sin resultados concluyentes estadísticamente, nos provee de información de base que nos podría permitir realizar otros estudios con un mayor número de muestra y continuar trabajando en este campo de estudio.

I. INTRODUCCIÓN

Recientemente, CeSIAM ha tenido acceso a una nueva e innovadora tecnología para cuantificar vitamina A como retinol en muestras de alimentos y fluidos en sustitución al método de cromatografía HPLC, que tiene costos elevados, se necesita personal entrenado y un laboratorio sofisticado. Para superar estas limitaciones la compañía BioAnalytGmbH en Telbow, Alemania, desarrollo un equipo que permite realizar los mismos análisis pero basados en la detección fluorométrica de la vitamina A. El kit consiste en viales reactivos desechables iEx™ Mila y un espectrofluorómetro portátil iCheck™ Fluoro.

En Guatemala, existe la fortificación de azúcar con vitamina A por decreto legislativo 56-747 y puesta en operación con base en el reglamento- Acuerdo Gubernativo 105-74, a partir de 1975, resultante de las altas prevalencias de vitamina A que se encontraron entre los años 1965-1967. En ese período, la deficiencia de esta vitamina en la población era de 26% en niños preescolares, quienes presentaron niveles por debajo de lo considerado normal.(Conafor, 2009 Unicef, 2009, Incap/OPS, 2009). La respuesta para combatir la deficiencia fue la fortificación del azúcar. La metodología fue desarrollada en el INCAP por el distinguido bioquímico Dr. Guillermo Arroyave (Arroyave *et al*, 1981) Posteriormente a la implementación de la estrategia a nivel nacional, se realizaron estudios de campo, en los cuales se evidenció que en menos de seis meses había un aumento de retinol en la población, debido a esta exitosa intervención. (Arroyave *et al*, 1981). Se observaron aumentos de retinol plasmático, retinol hepático en las personas que fallecieron accidentalmente y también retinol en la leche materna. (Conafor, 2009 Unicef, 2009, Incap/OPS, 2009).El retinol en leche materna nos puede ayudar a conocer, tanto el estado de vitamina A de la madre como de su hijo lactante. (Haskell, 1999).

Este estudio tuvo por objetivo principal evaluar el cambio en la concentración de vitamina A en la leche materna madura de doce madres lactantes, después de consumir azúcar fortificada con vitamina A, la cual fue cuantificada por medio del espectrofluorómetro iCheck™ Fluoro. Así mismo se evaluó si se existía una diferencia en la concentración de vitamina A en la leche materna, entre el consumo de azúcar fortificada, azúcar sin fortificar, y azúcar fortificada y grasa.

CeSSIAM junto con la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) pretende complementar los estudios previos realizados ya en Guatemala, haciendo uso de este nuevo instrumento, para la medición de concentración de vitamina A en leche materna en Guatemala y observar si existe una relación entre el consumo de vitamina A y el aumento de retinol en la leche materna.

II. ANTECEDENTES

A. Leche materna

La leche proveniente de la madre ofrece al niño el alimento ideal y completo durante los primeros 6 meses de vida y sigue siendo la óptima fuente de lácteos durante los primeros 24 meses de edad, al ser complementada con otros alimentos luego que el niño cumpla su primer año de vida. Desde el punto de vista nutricional, la infancia es un periodo muy vulnerable, ya que es el único período en que un solo alimento es la única fuente de nutrición y justamente una etapa de maduración y desarrollo de sus órganos. (Shellhor, 1995).

Según una revisión de ensayos controlados aleatorios de 14 países realizada por Britton C y cols. Se encontraron pruebas de los beneficios de salud a corto y largo plazo de la lactancia materna para los recién nacidos y la madres. Los beneficios tempranos encontrados incluyen disminución de la mortalidad en los recién nacidos prematuros, disminución de la morbilidad infantil debida a infecciones digestivas, respiratorios, urinarias y del oído medio, así como menos frecuencia de enfermedades atópicas. (Britton, 2008) (Broche, 2011).

Así mismo en esta revisión se menciona que la lactancia materna ofrece protección contra la aparición de enfermedades de la niñez como la diabetes mellitus insulino dependiente (tipo I) de comienzo juvenil; aumento de la presión arterial; obesidad. La lactancia materna también se asocia con puntuaciones significativamente mayores de desarrollo cognitivo. (Britton, 2008).

En un revisión de la Universidad de Murcia, España, en la cual se revisaron varios estudios, se señala que la leche materna modula la función y la integridad del tracto gastrointestinal no solo durante el tiempo de lactancia si no que en la infancia también. Esta funcionalidad se base en distintas observaciones en niños alimentados con leche materna, entre las observaciones se encuentra que: los niños prematuros alimentados con leche materna parecen ser más resistentes a la enterocolitis necrotizante que los niños alimentados con fórmulas infantiles. Los niños alimentados con leche materna muestran pocos signos de inflamación intestinal durante infecciones entéricas agudas, estos tiene menor

riesgo de mala absorción intestinal, y parece ser que existe un menor riesgo de que los niños mayores sufran enfermedad de Crohn, artritis, linfomas y como se mencionó anteriormente en el estudio de Britton también se disminuye el riesgo de padecer diabetes. (Gómez, 2009).

La leche lactancia es un fluido que se adapta a los requerimientos nutricionales e inmunológicos del niño a medida que este crece y se desarrolla, porque se le llama vivo. La leche materna se distingue en cuatro tipos diferentes: la leche pre término, el calostro, la leche de transición y la leche madura. (Shellhor, 1995) Es importante hacer énfasis en los diferentes tipos ya que de esto dependen las características cualitativas y cuantitativas al trabajar con leche materna.

Las madres que tienen un parto antes de las 37 semanas de la gestación se les llaman pre término y así mismo se le conoce a la leche que producen. El niño pretérmino tiene requerimientos más elevados de proteína y su sistema gastrointestinal está más inmaduro, así como su producción de lactosa. Por lo tanto la leche de estas madres contiene una mayor cantidad de proteína y menor cantidad de lactosa que la leche madura, siendo una combinación más tolerable. Pero existen excepciones donde un bebe pre término tenga muy bajo peso, por lo que ni aun la leche pre término que produce la madre puede cubrir sus requerimientos. (Shellhor, 1995)

La primera fase de la leche se le llama calostro, esta es líquido amarillento y espeso de alta densidad y poco volumen la cual se produce durante los primeros 3 a 4 días después de parto. En los primeros 3 días el volumen producido es de 2 a 20 ml por mamada. El primer día se produce menos de 100ml, pero esto aumenta entre las 36 a 48 horas postparto, y luego se nivela hasta una producción de volúmenes de 500-750ml en 24 horas durante los primeros 5 días post parto. (Shellhor, 1995)

Luego del calostro, se produce la leche llamada de transición durante el 4to día y el 15 día postparto. Entre el 4to y 6 días se produce un aumento brusco en la producción de leche, que comúnmente se le llama la bajada de la leche, la producción continúa aumentando hasta aproximadamente 600 a 800ml/día entre los 8 a 15 días postparto. La leche de transición va variando no solamente de

volumen, sino que cambia hasta alcanzar la composición nutricional de una leche madura. (Shellhor, 1995).

La leche materna madura tiene una gran variedad de elementos, de los cuales solo algunos son conocidos, la variación de sus componentes se observa no solo en mujeres, sino también en la misma madre, entre amabas mamas, entre lactadas, durante una misma mamada y en las distintas etapas de la lactancia. (Shellhor, 1995). Ahora bien la producción máxima de la leche materna se alcanza entre el tercero y el quinto mes de lactancia y se mantiene constante en los meses siguientes. (Macías, 2006)

1. Composición de la leche materna. La composición de la leche materna como se menciona anteriormente varía dependiendo el desarrollo del niño, así mismo varia de madre a madre, en el transcurso del día, incluso cambia su composición en una misma mamada. La fracción más estable es la proteica y la de mayor variabilidad es la grasa. La leche materna se forma en la propia glándula mamaria utilizando los componentes presentes y los nutrientes maternos necesarios. Son muchos los factores que influyen su composición y en el volumen de la secreción láctea, desde factores genéticos, estado nutricional del madre, hasta la técnica de extracción, almacenamiento y administración al bebe. (Díaz-Arguelles, 2005)

a. Componentes nitrogenados. La leche materna incluye dos fracciones nitrogenadas, el 75% la representa el nitrógeno protéico, y el otro 25% el nitrógeno no protéico que incluye urea, creatinina, creatina, ácido úrico, aminoácidos libres, amoniaco, poliaminas, hormonas, nucleótidos cíclicos, y oligosacáridos que contienen nitrógeno. Ahora la fracción nitrogenada está compuesta por dos grupos de componentes: la caseína y las proteínas del suero. (40:60). (Macías, 2006). La cantidad de proteínas es mayor durante las primeras semanas, y vadececiendo de 15 a 8-9g/l, El nitrógeno protéico cumple funciones como: aportar aminoácidos esenciales, factores inmunológicos como lizosimas y lactoferrina, también son vehículo para vitamina B12, folatos y vitamina D; aportan hormonas, actividad enzimática y otras actividades biológicas. Mientras que la fracción de nitrógeno no proteico la taurina y los nucleótidos han cobrado importancia. A los nucleótidos se les atribuye su papel

como inmunomoduladores, promotores de bifidobacterias y favorecedores de la maduración y proliferación gastrointestinal. (Díaz-Arguelles, 2005).

b. Carbohidratos. La lactosa es el principal carbohidrato en la leche materna presente en un 70%, se sintetiza a partir de glucosa. Aporta junto con los lípidos la energía necesaria para el crecimiento y desarrollo del lactante. Esta alcanza una concentración de 68g/l. Los otros carbohidratos que están presentes en concentraciones inferiores son la glucosa, galactosa, oligosacáridos complejos y glicoproteínas. La presencia de lactosa aumenta la absorción de calcio, fósforo y disminuye el pH, lo cual reduce la posibilidad de crecimiento de bacterias patógenas. (Díaz-Arguelles, 2005).

c. Lípidos. Las grasas representan una fuente importante de energía, aportan aproximadamente el 50% de las calorías totales. Son fuentes de ácidos grasos esenciales y vehículo de vitaminas liposolubles, cuya absorción favorecen. Realizan aporte de omega 6 y 3 logrando una síntesis equilibrada de eicosanoides. Los lípidos están compuestos en 98% de triglicéridos. El ácido oleico y el palmítico son los ácidos grasos más abundantes y el ácido esencial linoleico es el tercero en abundancia. Los ácidos grasos saturados representan el 47% y los insaturados el 53% aproximadamente. (Macías, 2006). La leche humana es la única fuente exógena de estos ácidos grasos para el recién nacido durante los primeros meses de vida, contiene una cantidad variable de ácidos preformados araquidónico (AA) y docosahexaenóico (DHA), de gran importancia para el lactante en todas sus etapas. (Díaz-Arguelles, 2005). Los lípidos en la leche materna son los nutrientes de mayor rango de variabilidad, cualitativa como cuantitativamente, la concentración total no cambia con las variaciones de la dieta de la madre, sin embargo la composición de los lípidos de la leche materna si pueda variar. En áreas geográficas donde es frecuente la desnutrición, la cantidad de grasa corporal de la madre puede afectar la concentración de lípidos de la leche. Así mujeres con escasa cantidad de grasa corporal producen leche con algo menos de lípidos. (Guayo, 2004).

1) Método de cuantificación de grasa en leche materna. El componente calórico más importante de la leche humana son lípidos, debido a esto se ha

estudiado la manera de cuantificarla. Fleet y Linzell en 1963 encontraron un micro método para valorar de forma aproximada, la concentración de lípidos en la leche bovina. El método consistía en la centrifugación de la leche en tubos capilares, leyendo el sobrenadante (fracción de crema= crematocrito), expresándola en porcentaje. El crematocrito (lactocrito o galactocrito), es una técnica sencilla y de rápido acceso, únicamente se necesita tubos capilares utilizados para microhematocrito, una centrifuga y un lector de crematocrito, en caso de no tenerlo se puede utilizar reglas milimetradas. Lucas y cols. aplicaron el mismo método para leche humana. (Mayans. E y Martell M.1994). Con ayuda de este método, se puede determinar el contenido de grasa utilizando el % de crematocrito y la siguiente ecuación: $Fat (g/L) = (Crematocrito(\%)-0.59)/0.146$ y $Kcal/L = (290+66.8)* \%Crematocrito$. (Lucas y cols, 1978). En este estudio se utilizó este método para conocer el porcentaje de grasa de la leche.

d. Minerales. La concentración de minerales así como todos los compuestos de la leche materna, están adaptados para que cumplan con los requerimientos y capacidad metabólica del lactante. Los minerales que presentan una gran biodisponibilidad en la leche materna, son magnesio, calcio, cobre, zinc y calcio. El fósforo en la leche materna el 23% se encuentra unido a proteínas, el 15% se encuentra en forma de fósforo inorgánico y la cantidad restante aparece unido a lípidos. Otro micronutriente importante es el hierro el cual es esencial para la producción de glóbulos rojos y el transporte de oxígeno y en el desarrollo cognitivo. El zinc es esencial para el crecimiento y desarrollo del niño, está involucrado en el desarrollo del sistema inmunológico, hormonas, y además ser cofactor de enzimas que intervienen en procesos metabólicos. El zinc a lo largo de la lactancia, se encuentra en una distinta distribución, pero en la leche madura, que es la mayor parte del periodo de lactancia se puede encontrar que alrededor del 30% se encuentra ligado a lípidos, 20% a la caseína y 50% restante a componentes del suero lácteo. El cobre es un mineral requerido para la utilización de hierro y cofactor de enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa y la síntesis de hemoglobina, tejido conectivo y fosfolípidos. (Macías, 2006).

e. Vitaminas. Al contrario de lo que usualmente se cree, la a leche de una madre bien nutrida contiene en cantidad suficientes las vitaminas para el normal desarrollo del lactante. La vitamina D se considera una parahormona, con funciones hematopoyéticas y propiedades inmunoregulatoras. Cumple funciones importantes en la mineralización ósea al incrementar la absorción intestinal de calcio, fósforo y la reabsorción renal de calcio. (Macías, 2006).

Como se mencionó anteriormente la grase de la leche actúa como vehículo de las vitaminas liposolubles. La vitamina A interviene en el proceso de visión y es necesaria para el crecimiento normal, la reproducción, el desarrollo fetal y la respuesta inmunológica. Su concentración en la leche humana es variable, ya que depende de la ingesta materna. En la siguiente sección se describe a profundidad la vitamina A y su papel en la leche materna. (Macías, 2006).

B. Vitamina A

La vitamina A es un término genérico que se designa aquellos compuestos con estructura "B-ione" que presentan la actividad biológica del retinol. En la dieta la vitamina A se encuentra solo en productos animales, principalmente en hígado, huevos y leche. Las formas precursoras de la vitamina A son los carotenoides que tiene actividad biológica de vitamina A después de convertirse en retinol en el intestino; los más importante son: beta-Caroteno, alfa-caroteno y criptoxantina. Estos están presentes principalmente en vegetales verdes y amarillos y en la fruta. (Gómez, 2008). La cantidad de vitamina A dietética se expresa en unidades de peso: Equivalentes de retinol (ER). Un microgramo de ER corresponde con 1µg de retinol, antiguamente se definía en Unidades internacionales (UI) que corresponden a 0.3µg de retinol (Gómez, 2008)

Cuadro. 1 Equivalencia de los compuestos con actividad de vitamina A y sus relacionados.

| | |
|---------------------------|--------------------------|
| | 1 µg retinol (3.33 IU) |
| 1 ER | 6 µg beta-caroteno |
| | 12 µg otros carotenoides |
| | provitamina A |
| 1 µg retinol | 1 ER |
| 1 µg beta-caroteno | 0.167 ER |
| 1 µg otras provitaminas A | 0.084 ER |

(Adaptado de: (Gómez, 2008))

La vitamina A juega un papel fundamental en la función visual, así como en otros procesos fisiológicos como son el mantenimiento del tejido, epitelial, el crecimiento, la reproducción, y la inmunidad. Su influencia es particularmente importante en periodos de rápida proliferación y diferenciación celular, como la gestación y la infancia temprana. (Gil, 2010)

En un adulto la ingesta recomendada en mujeres con estado nutricional normal es de 1000 y 800 µg/día, suponiendo que el 50% de la vitamina en la dieta deriva del retinol y el 50% del betacaroteno. Esto equivale a 10-50 µg /Kg de peso/día. Pero en el período de la lactancia la ingestas recomendadas aumentan en 500 µg con respecto a las ingestas recomendadas para las mujeres normales. (Gil, 2010)

Actualmente se conoce que la dieta de la madre lactante es fundamental para la nutrición de los niños en la infancia temprana, pues su alimentación y estado nutricional influyen sobre la calidad y cantidad de leche segregada. El contenido de vitaminas de la leche materna trata de cubrir los requerimientos adecuados para el lactante y sus valores van a depender del estado de nutrición y del aporte de vitaminas que recibe la madre. En cuanto a las concentraciones, las de

retinol y carotenos en suero y leche humana son similares y están correlacionados con la dieta que la madre ingiere. (Gómez, 2008)

Los niños nacen con bajas reservas de vitamina A. Solo un alimento, la leche materna puede ayudar a aumentar sus reservas. (Moreira, 1997). La leche de una madre bien nutrida proporciona cantidades suficientes de vitaminas para el normal crecimiento del bebe. La grasa de la leche actúa como vehículo de las vitaminas liposolubles. (Macías, 2006).

Como se mencionó la leche materna es una buena fuente de vitamina A el autor Riordan menciona en su artículo que contiene 200 IU/dl, pero que está presente principalmente como retinol en concentraciones de 40-53µg/dl. (Riordan, 2009).

Se ha encontrado reportado en algunos artículos que los niveles de vitamina A en la leche materna varían junto con la edad, y el estado nutricional de la madre lactante. En mujeres lactantes, con un estado nutricional adecuado, el calostro contiene 151 µg/100ml, leche de transición contiene 88µg/100ml y la leche madura 75 µg/100ml de vitamina A. El concilio nacional de investigación de los estados unidos (NRC), da un rango de 40-70 µg/100ml de vitamina A en la leche de mujeres con estado nutricional normal, en los Estados Unidos y Europa. Se remarca también que las concentraciones de vitamina A en la leche de madres no suplementadas, de países en desarrollo alcanza solo la mitad de estos niveles. (Ross, 2003)

Tanto en países desarrollados y no desarrollados los niveles de vitamina A disminuyen con el tiempo. El calostro tiene una concentración particularmente alta de retinol, pero durante el primer mes de edad del lactante, el nivel de esta vitamina disminuye rápidamente a menos de la mitad de la concentración. (Ross, 2003)

1. Propiedades del retinol

a. Propiedades físicas. Se le denomina "retinoide" a todas las formas de vitamina A, algunas se puede observar en el Cuadro 1, debido a su enorme importancia en la fisiología de la retina. Incluso a sus análogos sintéticos también se les da el mismo nombre, aunque algunos solamente consideran retinoides solo a los derivados sintéticos y análogos de la vitamina A. Se pueden

englobar dentro del término aproximadamente 1500 formas. La mayoría de las formas son compuestos cristalinos con un punto de fusión bajo. Para su identificación se utiliza un espectro de absorción característico. Cuando se irradia con luz UV el retinol emite una fluorescencia amarilla con verde, mientras que otro compuesto como el 3dehidrorretinol emite la fluorescencia de color marrón con naranja. Esta vitamina es muy sensible al oxígeno del aire, especialmente en presencia de luz y calor. Las formas comerciales de Vitamina A se presentan en forma oleosa, también como una emulsión acuosa o polvo. Este tipo de productos deben almacenados en un ambiente protegido de luz y oxígeno. (Hernández, M. *et al.* 1999)

b. Absorción y distribución bioquímica del retinol. Para su absorción el retinol debe pasar por una digestión inicial, con la ayuda de enzimas proteolíticas en el estómago e intestino, las moléculas son liberadas de las proteínas a las cuales estaban ligadas. Por su parte los esteres de retinol son hidrolizados, de modo que el retinol libre se pueda absorben de mejor manera en el duodeno y yeyuno, por difusión facilitada por micelas y por transporte activo mediante la proteína fijadora de retinol tipo II presente en los enterocitos del intestino. (Gil, 2010).

Los alimentos de origen animal contienen principalmente vitamina A en forma de retinol y retinil ésteres (palmitato). El azúcar esta fortificado con retinil palmitato. Los retinil ésteres ingeridos son hidrolizados por lo hidrolasas pancreáticas en el lumen intestinal y en el borde del cepillo del intestino. Las grasas y ácidos biliares facilitan la absorción del retinol libre que ocurre por una difusión facilitada o activa dependiente de energía.

El retinol es esterificado por un acil-trasferada contenida en los microsomas del enterocito con palmitato (50-60 por 100) y trasportado desde el intestino al hígado por los quilomicrones y VLDL intestinal. (Hernández, M. *et al.* 1999)

Los quilomicrones son secretados posteriormente a la circulación sanguínea, a través del sistema linfático, o se almacenará en el hígado. La eficacia de absorción de los esteres de retinol es de 80-95%, de los esteres de retinol y 40-60% de los beta carotenos. (Gil, 2010).

En la distribución del retinol y los carotenoides, es importante conocer que los quilomicrones están compuestos por esterios de retinol, retinol libre y carotenoides no hidrolizados, esterios de colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y apolipoproteinas. Los quilomicrones son liberados por el sistema linfático, a la sangre. En este transporte se produce una metabolización inicial, por lo que los quilomicrones luego que los triglicéridos se hidrolizaron, llevan a los esterios de retinol hacia el hígado. (Gil, 2010).

Para que se transporte la vitamina A, en el hígado el todo-trans-retinol se une al proteína transportadora de retinol (apo-RBP), formado el complejo holo-RBP, luego este complejo se une con la prealbúmina. Esto minimiza las pérdidas renales por filtración glomerular y aumenta la estabilidad del retinol. (Gil, 2010).

c. Retinol y sus beneficios contra el cáncer. Se menciona en algunos textos que los alimentos ricos en retinol son protectores contra algunos cánceres como: los orofaríngeos, laringe, estómago, colon y vejiga. Así mismo se han puesto en manifiesto una relación entre el déficit de vitamina A y cáncer de pulmón. Este beneficio de los alimentos ricos en Vitamina A se adjudica a que estos protegen contra la formación de radicales libres de oxígeno y contra la formación de peroxidación de los lípidos en el cuerpo humano. (Cameán y Repetto, 2012)

d. Interacciones con medicamentos. Generalmente los fármacos disminuyen en el intestino la absorción, por lo que también pueden reducir la absorción de vitamina A. Se ha comprobado que catárticos y laxantes dificultan la absorción, por lo que el uso de aceite mineral como laxante puede reducir los niveles de beta caroteno en la sangre. Así mismo los medicamentos que tiene alguna acción sobre las sales biliares, como la colestiramina y la neomicina secuestran ácidos biliares, inhibiendo la absorción de grasas y por lo tanto de vitamina A que es una vitamina liposoluble. El consumo de fenobarbital y cafeína pueden disminuir las reservas de vitamina A. Asimismo, las inyecciones de corticosteroides causan una rápida pérdida de vitamina A del plasma, hígado, glándulas adrenales y timo. Por su parte los anticonvulsivos incrementan las concentraciones de vitamina A en la sangre (Gil, 2010).

e. Toxicidad. El exceso de esta vitamina se pueda dar en niños como adultos al ingerir más de 50.000 UI en la forma de retinol (vitamina A preformada) (12 veces las RDA) durante varios meses en la cual se clasifica como toxicidad crónica, o más de 660.000 UI de vitamina A preformada en una sola dosis que se clasifica como toxicidad aguda. Es por esto que se debe tener precaución en las personas que reciben dosis terapéuticas sin tener en cuenta estos riesgos. Los síntomas de la hipervitaminosis son cansancio, falta de apetito, vómitos, cefalea, diplopía, incoordinación motora, queilitis, estomatitis, conjuntivitis y en general alteraciones cutáneas y de las membranas de la mayor parte de las mucosas. También se puede presentar hepatomegalia, hipercalcemia e hipoprotrombinemia. (Gil, 2010).

Pueden producirse otras alteraciones oculares ya que el exceso de vitamina A y sus metabolitos pueden acumularse en la retina como resultado de un bloqueo en su utilización y su metabolismo en presencia de dosis elevadas. También en mujeres embarazadas es importante evitar las megas dosis de esta vitamina, ya que los retinoides pueden ser teratogénicos. Las anormalidades más comunes en los fetos son craneofaciales como: microcefalia, alteraciones cardiacas congénitas, defectos en el riñón, el timo, y sistema nervioso. Se presume que estas alteraciones se pueden deber a la interacción de los retinoides con la actuación sobre la expresión del gen Hoxb-1, que regula la diferenciación de las células en el embrión. (Gil, 2010).

Los efectos tóxicos de los carotenoides son bajos, pero se pueden acumular en la piel, produciéndose hipercarotenodemia, pero es reversible al cesar el consumo excesivo de carotenos. Los betas carotenos se han asociado en los fumadores con una alta incidencia de cáncer de pulmón, esto debido a que los betas carotenos pueden favorecer el aumento de los derivados químicos carcinógenos del humo del tabaco en el pulmón, al estimular enzimas metabólicas. (Gil, 2010).

Según el Food and Nutrition Board del Instituto of Medicine (FNB) de Estados Unidos y Canadá y el Council for Responsible Nutrition (CRN). El nivel sin efectos adversos observados (No observed adverse effects level, NOAEL) que está establecido para la vitamina A es de 5000 UI (14.520µg). Mientras que el nivel

mínimo de efectos adversos observados (LOAL por sus siglas en inglés), fue establecido en 46.000 UI (14000 µg). (Gil, 2010).

2. Hipovitaminosis. La hipovitaminosis o deficiencia de vitamina A afecta a unos 253 millones de niños escolares en el mundo. En la mayoría de países en vías de desarrollo la hipovitaminosis es una consecuencia de la malnutrición, mientras que en otros países, desarrollados la hipovitaminosis es consecuente con diversas enfermedades. En varios estudios epidemiológicos se ha observado que en países en desarrollo es común una coexistencia de anemia por deficiencia de hierro junto con la deficiencia de vitamina A. (Dary, 1994)

El retinol en leche materna nos puede ayudar a conocer, tanto el estado de vitamina A de la madre como de su hijo lactante. (Haskell, 1999). Se establece que menos de 300 µg RE/L son valores encontrados en leche de madres desnutridas, mientras que 700 µg RE/L son valores encontrados en mujeres con estado nutricional adecuado. (Ross, 2003)

Según informes de 1994, en Centroamérica la deficiencia de Vitamina A es principalmente del tipo subclínico o marginal. Las causas de estas deficiencias son la dieta pobre en grasa y retinol o sus precursores carotenoides y la alta incidencia de parasitismo intestinal y enfermedades diarreicas y respiratorias. Según el informe valorativo de daño en 1994 para Guatemala de UNICEF las muertes de aproximadamente 1500 niños cada año son debidas al aumento de la propensión a infecciones debido a la deficiencia de esta vitamina, también informan que el 20% de los niños guatemaltecos crecen con baja inmunidad, lo que les conduce con frecuencia a tener una mala salud y un crecimiento pobre. La deficiencia de esta vitamina daña el sistema inmunológico por lo que las enfermedades son más frecuentes y más graves, incrementando la tasa de mortalidad de los niños menores de 5 años de edad. (Dary, 1994).

3. Fortificación de azúcar con vitamina A. El Instituto de nutrición de Centroamérica y panamá (INCAP) propuso reducir la deficiencia de vitamina A por medio de la fortificación del azúcar con dicha vitamina, para la cual desarrollo el proceso y las metodologías de control de calidad y demostró la validez tecnología y biológica de la medida. (Dary, 1994)

La hipovitaminosis fue reconocida como un problema de salud pública en todos los países de la subregión en las encuestas nutricionales realizadas en 1965 a 1997, por medio de estimaciones dietéticas como los niveles bajos en retinol sérico. (Dary, 1994). En ese momento se encontró una deficiencia en la población, 26% de los niños preescolares presentaron niveles por debajo de lo considerado normal. Conafor, (Unicef, INCAP/OPS, 2009)

La respuesta para combatir la deficiencia fue la fortificación del azúcar, la investigación para la fortificación del azúcar, fue promovido por el INCAP, liderado por el Lic. Guillermo Arroyave con el apoyo del Dr. M Forman. Luego de la implementación inicial de la fortificación de azúcar nacional en 1975 en cumplimiento con el Decreto legislativo No. 56-74 con base en el reglamento Acuerdo gubernativo 105.74. Debido además de la crisis económica, a la resistencia de la industria azucarera y la falta de voluntad política se suspendió la fortificación. Los estudios realizados en el INCAP por el Dr. Oscar Pineda- pero no publicado formalmente- en la década de 1980 mostraron una persistencia de la hipovitaminosis en niños guatemaltecos. (Arroyave et al, 1981). (Conafor, Unicef, INCAP/OPS, 2009)

En respuesta a un esfuerzo concertado por parte del INCAP, el comité pro ciegos y sordos con la asistencia técnica de la empresa Hoffman-La Roche de Suiza, la industria azucarera voluntariamente acordó reiniciar el proceso de fortificación de azúcar con retinol palmitato en 1987. Cinco años más tarde en 1992, con nuevas leyes y decretos (Ley Decreto Legislativo 4-92, plasmado en Acuerdo gubernativo no. 497-93, modificado en el Acuerdo Gubernativo no. 750-93) se restableció el mandato para la fortificación de azúcar de mesa granulada con vitamina A y se integraron todas las leyes de fortificación de alimentos en una sola ley. (Mora, 2000). Los niveles de adicción especificados debían ser de 10 a 20 mg/kg de azúcar, con una media de 15mg/kg (15ppm). Durante las siguientes dos décadas hasta el día de hoy, la fortificación a continuado con regularidad, siendo monitoreado por un laboratorio especializado en el INCAP. (Cadenas, 2008) (Mora, 2000)

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el INCAP pusieron en marcha el “Programa de fortificación de azúcar con vitamina “A” en Guatemala”, logrando en el 2000 abastecer al 77% de población con azúcar fortificada con

vitamina "A". En el año 2000, se realizaron modificación respecto al requerimiento de la fortificación de azúcar importada. Esto quedó plasmado en el acuerdo gubernativo 021-2000 celebrado el 7 de enero del 2000. En el 2001 se llevo a cabo un estudio don se evidencia que la mayor parte de los hogares guatemaltecos reciben azúcar fortificada con valore o concentración de vitamina "A" superiores a 3.5mg/kg. (Cadenas, 2008).(Conafor, Unicef, INCAP/OPS, 2009).

El azúcar fue seleccionada en Centro América como el vehículo o alimento a ser fortificado con vitamina "A", ya que es consumida en cantidades constantes. El consumo promedio de azúcar en Guatemala es de 67.5g/persona día. Así mismo este producto es utilizado de maneras que no afectan sus características organolépticas. (Dary, 1994) (Cadenas, 2008).

a. Proceso de fortificación del azúcar. El objetivo es asegurar que se satisfagan las necesidad de Vitamina A de los grupos con mayores riesgo de sufrir deficiencia. El nivel de vitamina A que se agrega está determinado por los requerimientos nutricionales y los patrones de consumo de azúcar. Los niños menos de 5 años son los más vulnerables a la hipovitaminosis A y su ingesta diaria recomendaba es de 400 ER. Las mujeres embarazadas tienen una ingesta diaria recomendada de 600 µg ER. (Cadenas, 2008).

El proceso de fortificación se lleva a cabo en dos fases: Elaboración del pre mezcla: Debido a que la cantidad de vitamina A que se agrega al azúcar es tan pequeña, se realiza primero una pre mezcla; esta facilita la disolución de dicha vitamina en una pequeña cantidad de azúcar. Luego se agrega al loto completo para la fortificación final, obteniendo un producto más homogéneo. (Cadenas, 2008).La fortificación de azúcar: la pre mezcla preparada tiene una concentración elevada de vitamina A y no es apropiada para el consumo humano. La formulación está diseñada para proporcionar un exceso teórico del 10%. Esta pre mezcla deberá ser agregada al azúcar con una proporción adecuada para el consumo humano (1:1000) de manera que el producto tenga la cantidad seleccionada de 15µg de RE/kg de azúcar. (Cadenas, 2008) (Guamuch, 2007). Estabilidad de la fortificación La vitamina A contenida en la azúcar fortificada permanece estable en los alimentos preparados en el hogar, a pesar de que la humedad, el calor y la acidez reducen su actividad. Cuando se agrega

azúcar fortificada a bebidas tales como limonada o naranjada, se conserva entre 60% a 80% de la vitamina A, después de dos días. La vitamina A es sensible a los ácidos, por lo que se pueden esperar pérdidas cuando entra en contacto con alguno de ellos. Sin embargo, la mayor parte de la vitamina A contenida en la azúcar fortificada se puede perder en la fabricación de bebidas gaseosa como consecuencia del uso de carbón activado y tierra de diatomeas para eliminar el color y las impurezas. La estabilidad de la vitamina "A" en los alimentos horneados también es buena. (Cadenas, 2008).

4. Métodos de Cuantificación de vitamina. Las concentraciones séricas de retinol están controladas homeostáticamente, por lo que no disminuyen hasta que las reservas hepáticas de la vitamina están muy bajas. Debido a esto se desarrollan diversos métodos que puedan reflejar las reservas de esta vitamina, e indiquen su deficiencia, destacando la prueba de la respuesta a la dosis relativa (RDR) y la prueba a la respuesta modificada a la dosis relativa (MRDR). (Gil, 2010)

La prueba RDR se basa en el principio que durante la hipovitaminosis A, la apo-RBP se acumula en el hígado, debido a que no ha suficiente vitamina que ligar. Se realiza una medición inicial de vitamina A en suero, luego se administran dosis de esteres de retinol y se mide nuevamente 5 horas después de la ingesta. Se espera que la vitamina A se una al exceso de RBP almacenado, con lo que se producirá un aumento de vitamina A en el suero respecto a la medición inicial, el cual se valora en forma de porcentaje. (Gil, 2010)

La otra prueba MRDR se basa en el mismo principio que el anterior, pero se utiliza 3,4-dideshidrorretinil-acetato, debido a que las concentraciones del compuesto en el suero son bajas, no se utiliza una muestra inicial, únicamente una muestra 4 a 6 horas después de la ingesta del compuesto. Luego de obtener las muestras los métodos usados para el análisis de la vitamina A en plasma, leche, tejidos, y alimentos, son la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por su siglas en inglés), unida a una espectrofotometría ultravioleta. (Gil, 2010).

A continuación se describe un poco más acerca de los métodos de cuantificación en el vehículo que nos interesa, la leche materna.

a. Cromatografía. El método más utilizado para la cuantificación de vitamina A en leche materna es la cromatografía. Esta es una técnica analítica de separación en la que una muestra compleja se desplaza en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido súper crítico, a través de una fase estacionaria, fijada a una columna o a una superficie sólida. (Fernández, 2002).

Las moléculas fuertemente retenidas por la fase estacionaria se moverán lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que las que se unen débilmente a la fase estacionaria serán arrastradas con rapidez por la fase móvil. Debido a esta distinta movilidad de los componentes de una muestra se van a separar en bandas o zonas discretas que podrán ser analizadas cualitativa o cuantitativamente. (Fernández, 2002).

1) HPLC. La cromatografía líquida de alta eficiencia es un tipo de cromatografía utilizada en el análisis de vitamina A en la leche. Esta es una técnica analítica de separación ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, a su adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas y a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias. Actualmente se llama cromatografía líquida de alta eficiencia y para incrementar la resolución, la velocidad y sensibilidad en la cromatografía líquida se han introducido columnas con partículas más pequeñas e instrumentos adecuados para bombear la fase móvil a presiones del orden de 1500psi o incluso 100000psi. (Fernández, 2002).

Una de las desventajas de este procedimiento es la gran cantidad de componentes básicos para un sistema de HPLC, los cuales son: depósitos para la fase móvil, sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil, dispositivo para la introducción de la muestra, columna cromatográfica, detector, sistema para el tratamiento de datos y registrador. (Fernández, 2002). Este tipo de cromatografía fue utilizada en la metodología descrita por Riberio en su artículo acerca de los efectos del procesamiento de la leche en la vitamina A,

este autor utilizó hexano como extractor, efectuó el análisis de 60 muestras. (Riberio, 2005). Oliveria también fue otro autor que realizó un estudio transversal analizando HPLC para detectar la vitamina A en madres donantes para un banco de leche. (Oliveria, 2010).

Estos solo son algunos de los estudios que ejemplifican el uso de la cromatografía, pero tienes las limitaciones del transporte de las muestras a un laboratorio y el análisis de pocas muestras por día.

b. Espectrofotometría. Es este método se utiliza muchos menos reactivos que el original y se tiene una exactitud y recuperación semejante, aunque su precisión es un poco menor, es muy satisfactoria. El método consiste en la extracción de palmitato de retinol en hexano. Se determina por medio de la absorbancia a 325nm. Se ha determinado que los métodos de extracción con hexano y el colorimétrico son precisos y confiables comparados con él la cromatografía al cuantificar la vitamina A en azúcar fortificada. (Jordan, 2004)

c. Espectrofluorometría

1) iCheck™ Fluoro. existe ahora en el mercado una nueva alternativa de análisis de vitamina A en leche ya sea de vaca o materna, como sustituto al método anterior de cromatografía HPLC, que tiene costos elevados, se necesita personal entrenado y un laboratorio sofisticado. Para superar estas limitaciones BioanalytGmbH desarrollo un equipo que ayuda a realizar los mismos análisis pero basado en la detección fluorométrica de la vitamina A. El kit consiste en viales reactivos desechables iEx™ Mila y un fotómetro portable el iCheck™ Fluoro (Schweigert, 2011)

Usando los aplicadores proveídos, se necesita únicamente 0.5ml de leche para ser inyectada directamente al vial. La muestra se debe agitar por 10 segundos para tener una mezcla homogénea y una buena extracción de vitamina A en la fase orgánica. Luego de este paso, la muestra debe dejarse reposar por lo menos 5 minutos para permitir una buena separación de la fase orgánica y la fase soluble. Finalmente el vial es directamente insertado en el fotómetro, el cual está calibrado para registrar lecturas de la fase orgánica, esta

medición se tarda aproximadamente 30 segundos para dar el resultado en $\mu\text{g/l}$. Si la cantidad de leche es limitada y se obtiene menos de 0.5ml de leche se puede usar agua para llegar hasta los 0.5ml, pero debe ser considerado el factor de dilución en el cálculo del resultado final. (Schweigert, 2011)

Figura1. Instrumento ICheck™Fluoro



Tomado de: (Bioanalyt,2011)

Figura 2. Fases de medición con Instrumento ICheck™Fluoro



Tomado de:(Bioanalyt, 2011)

Se menciona un estudio realizado con 30 muestra de leche de vaca y 16 muestras de leche materna en un periodo de lactancia de 4 meses, se buscó comparar la precisión de la medida utilizado HPLC y el fluorómetro iCheck™. Pudieron concluir que los resultados de los diferentes grupos de leche líquida estuvieron altamente correlacionadas (r^2 0.94) comparando el método de HPLC y método de iCheck®. En una de las instituciones participantes se reportaron valores que diferían entre métodos por -5% a +18%, pero estaban aun dentro de la varianza del método. (Schweigert, 2011).

El artículo aclara que aunque la exactitud y precisión puede ser un poco más baja que el método por HPLC, la simplicidad y rapidez del método lo hacen atractivo para análisis rutinarios y determinación de vitamina A en el campo, así mismo tiene las ventajas de que la muestra no necesita pre tratamiento como la centrifugación o saponificación antes de su análisis. Y el método permite analizar 45 muestras en una hora, comparado con el HPLC que se analizarían por lo menos en 1 día. (Schweigert, 2011)

En Guatemala, con el apoyo de CeSSIAM, se han realizado algunos otros estudios utilizando el iCheck™ Fluoro, y los viales de extracción iEx™ Mila. En el 2012 se hizo un análisis de 48 muestras de azúcar de distintas procedencias de Guatemala y 2 muestras importadas de Canadá como controles internos. El estudio concluyó el beneficio costo eficiencia del instrumento y la confirmación de diligencia en la fortificación de azúcar Guatemalteca. (Sánchez, 2012).

Otro estudio analizó leche entera, crema y diluciones de azúcar granulada en agua. En este estudio se realizaron lecturas por dos distintos investigadores en triplicado con el instrumento el iCheck™ Fluoro, y los viales de extracción iEx™ Mila. El objetivo fue realizar ensayos de precisión y reproductividad adaptando los procedimientos a circunstancias de trabajo de campo en Guatemala. El estudio concluyó una precisión y exactitud muy buena y apoya el uso de este método para trabajo de campo, al ser un instrumento con muy poco entrenamiento para su uso, fácil de utilizar, sin necesidad de un equipo de laboratorio e instrumentos de alto costo, además de ser portátil. (Zambo, 2013).

Un trabajo en campo, fue realizado utilizando este instrumento. Se analizó el contenido de vitamina A en leche materna de mujeres de origen Mam-mayas en el occidente de Guatemala. En este estudio se buscó determinar si existía una diferencia en la concentración de vitamina según el método de extracción y si existía un efecto en la congelación de las muestras a corto plazo. Se encontró que el método de extracción no influye en los valores de Vitamina A y que la congelación a corto plazo no afecta los niveles de vitamina A en la leche materna. (Whang, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

La deficiencia de vitamina A en las mujeres guatemaltecas, embarazadas y en período de lactancia, se debe al aumento en la demanda y la poca ingesta de vitamina A para llenar los crecientes requerimientos nutricionales en estas etapas reproductivas, junto con factores sociales y económicos. Debido a esta problemática, el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) propuso una estrategia de reducción de la deficiencia de Vitamina A por medio de la fortificación del azúcar con dicho micronutriente. El azúcar se seleccionó como vehículo de fortificación porque es consumida habitualmente por la población en riesgo y es un alimento que es utilizado en maneras que mantiene sus propiedades sensoriales. (Dary, 1994).

Según el Informe Anual Guatemala 2008 (Conafor, Unicef, INCAP/OPS, 2009), de la situación de los programas de fortificación de alimentos, en nuestro país los programas para la fortificación de azúcar con vitamina A están realizando una labor exitosa. En este informe se concluye que para el año 2007 el 91% de las muestras recolectadas en hogares, presentaron niveles adecuados de fortificación. (Conafor, Unicef, INCAP/OPS, 2009). La fortificación de azúcar es un programa que impacta de manera positiva a la población. De forma indirecta, al momento que una madre en período de lactancia consume este producto fortificado, los niños lactantes se ven beneficiados. Si bien se conoce que es un beneficio, no se conocen exactamente las concentraciones de vitamina A que reciben los lactantes, después de que sus madres consumen azúcar fortificada.

Haskel (1999) menciona los grandes beneficios para los lactantes de la vitamina A en la leche materna así como la influencia de la ingesta de este micronutriente de la madre. Así también resalta la importancia de realizar investigaciones que profundicen en la comprensión de los factores que afectan la transferencia de la vitamina A la leche, para evaluar profundamente varias estrategias para mejorar el nivel de vitamina A en la madre y el lactante.

Respecto al tema de fortificación y la entrega de esta vitamina A de madre a lactante, se han realizado diferentes estudios, tratando de identificar la relación existente. Algunos han demostrado que la suplementación de la madre lactante con altas dosis de

vitamina A aumenta la concentración de esta vitamina en la leche materna. (Ross, 2003) En países como Bangladesh, Indonesia e India se han realizado pruebas de suplementación donde se demuestra este incremento de los niveles de vitamina A en la leche. (Ross, 2003). Otros estudios en niños han demostrado que la suplementación de grasa mejora la absorción de beta- caroteno y mejora el estatus de vitamina A de la madre, ya que se encontraron mayores concentraciones de retinol en la leche materna suplementada con grasa. (Alam, 2010). Este tipo de estudios nos ilustran acerca del potencial indirecto del programa de fortificación con este micronutriente.

Aunque este tipo de iniciativas e investigaciones estén funcionando actualmente y han avanzado mucho en algunos países, en Guatemala, todavía existe la necesidad de un método con el cual se pueda determinar fácilmente, con alta precisión y exactitud el estatus individual y poblacional de una deficiencia o exceso de esta vitamina. En el 2011, Omar Dary validó un método nuevo para el análisis de leche utilizando el equipo iCheck™ Fluoro. Este es un espectrofluorómetro portátil de baterías, que puede aplicarse en la medición de Vitamina A. El análisis de las muestras es rápido y está validado con el método de cromatografía líquida HPLC (Frey, 2011). Esta es una innovación que pretende simplificar el análisis y monitoreo de la fortificación de los alimentos, por medio del análisis de muestras de fluidos y algunos alimentos, identificando deficiencia o exceso de la Vitamina A. (Frey, 2011)

El iCheck™ Fluoro solventa la necesidad existente de un instrumento el cual se pueda utilizar para diagnósticos poblacionales. En muchos casos profesionales en el área de salud y nutrición buscan diagnosticar una depleción de vitamina A antes de que ocurran los síntomas clínicos, como un efecto de la deficiencia de esta vitamina, que está asociada a un incremento de la morbilidad y mortalidad. (Tanumihardjo, 2002) (Alam, 2010) (Ross, 2003).

Con el propósito de implementar el uso en Guatemala, en el 2012 se realizaron varios estudios utilizando este instrumento, dos de ellos fueron realizados para probar su precisión, exactitud y facilidad de uso en el análisis en muestras de alimentos. (Sánchez, 2012, y Zambo 2013) Un tercer estudio fue realizado en el 2012, en donde se evaluaron muestras humanas de leche materna y se comprobó que el método de extracción no varía la concentración de la vitamina A en la leche materna y que la congelación a corto plazo no afecta los niveles de vitamina A en la leche materna. (Whang, 2012). Esta evidencia fue la base para el presente estudio, en donde se

pretendió hacer uso de este nuevo instrumento, efectivo y preciso para la medición de los cambios en la concentración de vitamina A en la leche materna después de ingerir diferentes tratamientos con azúcar fortificada y sin fortificar. Conociendo la precisión de este equipo por los estudios efectuados con anterioridad, se pretendía evaluar otras aplicaciones del producto que fueran más allá de la mera cuantificación de la vitamina. La cinética de la absorción de la vitamina A e incorporación en la leche materna es aún un tema no comprendido en su totalidad. Es necesario determinar la velocidad de la absorción de la vitamina A por la madre y su traslado a la glándula mamaria para su posterior excreción en la leche materna. Este estudio tenía como objetivo poder determinar el tiempo en el cual hay una concentración máxima de vitamina A en la leche materna que será ingerida por el lactante. También se quería determinar el efecto del consumo de grasa con la azúcar fortificada, ya que como es bien sabido, la absorción de vitamina A se incrementa significativamente en presencia de grasa.

IV. OBJETIVOS

A. General

1. Evaluar el cambio en la concentración de vitamina A en la leche materna madura de doce madres lactantes, al consumir azúcar fortificada con vitamina A, utilizando el espectrofluorómetro iCheck™Fluoro

B. Específicos

Fase piloto

1. Determinar si existe un incremento detectable en la concentración de vitamina A en la leche materna en respuesta a la ingesta de 450µg de retinol contenido en azúcar que será agregada a una bebida de cereales a los 90 ó 120 minutos después de haber ingerido una bebida de cereales con azúcar fortificada y grasa no láctea.

2. Determinar el porcentaje de grasa de la leche materna, para evaluar si existe un incremento detectable en la concentración de vitamina A en la leche materna en respuesta a la ingesta de 450µg de retinol contenido en azúcar que será agregada a una bebida de cereales a los 90 ó 120 minutos después de haber ingerido una bebida de cereales con azúcar fortificada y grasa no láctea.

3. Definir el lapso de tiempo en donde ocurriría el máximo de absorción de vitamina A, en 90 ó 120 minutos post tratamiento.

Fase definitiva

1. Determinar el cambio en la concentración de vitamina A en la leche materna madura de doce madres, corregida y no corregida por la concentración de grasa en la leche, 1 ½ horas después consumir una bebida de cereales con 45 gramos de azúcar fortificada.(450 µg)

2. Determinar la existencia de un cambio de concentración de vitamina A en la leche materna madura de doce madres, corregida y no corregida por la concentración de grasa en la leche, 1 ½ horas después consumir 45 gramos azúcar sin fortificar.

3. Determinar el cambio en la concentración de vitamina A en la leche materna madura de doce madres, corregida y no corregida por la concentración de grasa en la leche, 1 ½ horas después consumir 45 gramos (450 µg) azúcar fortificada, en combinación de 10 gramos de grasa.

4. Establecer si existe una diferencia entre la concentración de vitamina A en la leche materna de doce madres, al momento de ingerir tres distintos tratamientos: bebida de cereales con 45 gramos de azúcar fortificada, bebida de cereales con 45 gramos de azúcar fortificada y 10 gramos de grasa y bebida de cereales con 45 gramos de azúcar sin fortificar.

V. HIPÓTESIS Y VARIABLES

A. Hipótesis

Hipótesis de trabajo:

H₁: La concentración de vitamina A como retinol en la leche materna tendrá un cambio significativo dos horas después de que las madres ingieran azúcar fortificada con esta vitamina.

H₂: La concentración de vitamina A como retinol en leche materna tendrá un cambio significativo dos horas después de que las madres ingieran azúcar fortificada con esta vitamina y 10 gramos de grasa.

H₃: La concentración de vitamina A como retinol en la leche materna no tendrá un cambio significativo dos horas después de ingerir azúcar no fortificada

H₄: El cambio en la concentración de Vitamina A como Retinol en la leche materna será diferente significativamente entre los tres tratamientos.

Hipótesis nulas.

H₁: La concentración de Vitamina A como Retinol en la leche materna no tendrá un cambio significativo dos horas después de que las madres ingieran azúcar fortificada con vitamina A.

H₂: La concentración de Vitamina A como Retinol en leche materna no tendrá un cambio significativo dos horas después de que las madres ingieran azúcar fortificada con esta vitamina y 10 gramos de grasa.

H₃: La concentración de Vitamina A como Retinol en la leche materna si tendrá un cambio significativa dos horas después de ingerir azúcar no fortificada

H₄: El cambio en la concentración de Vitamina A como Retinol en la leche materna no cambiará significativamente entre los tres tratamientos.

B. Variables

Cuadro 2. Descripción de las variables estudiadas

| Variable | Definición conceptual | Naturaleza | Dimensión | Relación | Indicador | Escala |
|--|---|--------------|-----------|-------------|---------------------------|------------------------------|
| Concentración de Vitamina A como retinol | Cantidad de vitamina A en μg RE por litro, obtenida con la medición de un espectrofluorómetro portátil | Cuantitativa | Razón | Dependiente | μg RE/L | 50 - 3000 μg RE/L |
| Porcentaje de grasa | Valor obtenido en gramos por litro, luego de introducir en la fórmula: $(\text{Crematocrito}(\%)-0.59)/0.146$. Como crematocrito, la lectura de la fracción de crema sobrenadante en la leche materna contenida en un tubo capilar luego de centrifugarlo. | Cuantitativa | Razón | Dependiente | g/L | 0-100 |
| Concentración de vitamina A como retinol normalizado | Retinol corregido por la cantidad de grasa en la leche materna, $(\mu\text{g}/\text{L})/(\text{g}/\text{L})$ Valor de Retinol en μg por gramo de grasa, | Cuantitativa | Razón | Dependiente | μg /g de grasa | 0-3000 |

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

1. Recursos humanos. La investigadora principal fue la Dra. Mónica Orozco y como investigadora secundaria participó la estudiante Stephanie Gabriela Argueta, y se conto con el apoyo del Dr. Noel Solomons, Director Científico del Centro de Estudios en Sensoriopatías, Senectud e Impedimentos y Alteraciones Metabólicas (CeSSIAM). Todo el trabajo de campo realizado para la recolección de las muestras, fue realizado únicamente por la investigadora secundaria.

2. Recursos materiales y financieros. Se utilizaron recursos provistos por CeSSIAM, en calidad de préstamo, como el equipo, pero existen algunos materiales utilizados que fueron reembolsados en la totalidad del costo, por CeSSIAM. También se utilizaron recursos que fueron proveídos por la estudiante investigadora Gabriela Argueta. Todos los recursos materiales y financieros, se encuentran descritos a continuación:

Cuadro 3. Recursos físicos, materiales y financieros

| Insumo | Cantidad | Partida(Q) | Contrapartida |
|---|-----------------|-------------------|----------------------|
| Fluorómetro portátil iCheck Flouro | 1 | | No determinado |
| Viales de extracción iEx™ Mila | 144 | | No determinado |
| Micro centrífuga | 1 | | No determinado |
| Lector de crematocrito | 1 | | No determinado |
| Micro tubos cónicos (2ml) | 100 | | No determinado |
| Microcapilares | 200 | | No determinado |
| Bolsas Ziploc | 84 | 35 | |
| Jeringas 1ml | 96 | | No determinado |
| Plastilina | 1 | 15 | |
| Botes de muestras | 90 | 80 | |
| Fotocopias | 72 | 21,6 | |
| Algodón | 1 bolsa | 12,25 | |
| Alcohol | 1 bote | 16,16 | |
| Guantes | 1 caja | 18,95 | |
| Agua pura (Garrafón) | 2 | 32 | |

Continuación Cuadro 3

| Insumo | Cantidad | Partida(Q) | Contrapartida |
|------------------------------|-----------------|-------------------|----------------------|
| Morcaff | 1 libra | 12 | |
| Azúcar sin fortificar | 1 bote | | No determinado |
| Azúcar fortificado | 5 | 30 | |
| Crema no láctea Poll | 2 | 40 | |
| Desayuno las madres | 36 refacción | 430 | |
| Canasta de Alimentos | 12 canastas | 600 | |
| Total | | 1342,96 | |

3. Instrumentos. Se elaboró una guía de entrevista para la selección del participante donde se incluyen los criterios de exclusión e inclusión. Esta guía se utilizó para realizar el tamizaje en ambas fases, piloto y definitiva, las madres que participaron en ambas fases, únicamente realizaron la entrevista de la fase piloto. (Ver Apéndice 11)

Para llevar el control de las muestras recolectadas en la fase definitiva, se utilizó una hoja de recolección de datos (Apéndice 8. Hoja de recolección piloto), en la cual se incluyó el código de la madre, el volumen de la muestra basal, la hora en la cual se terminó su tratamiento, hora a la cual inicio la segunda extracción y volumen de la muestra post tratamiento. En una misma hoja, se llevó el registro de las 6 madres, facilitando las anotaciones.

En la fase definitiva, se llevó el registro, en dos hojas de recolección de datos, en la cual se incluyen los mismos aspectos que en la hoja de registro de la fase piloto. (Apéndice 9. Hoja de recolección datos fase definitiva)

B. Métodos

1. Enfoque, tipo diseño de investigación. Esta es una investigación con enfoque cuantitativo, tipo correlacional con diseño de investigación experimental. Se clasifica como tal debido a que tiene el propósito de probar la existencia de una relación causal entre variables, aunque en el caso de esta investigación, solamente permitiría estimar los impactos del tratamiento, dependiendo de si llega a establecer una base de comparación apropiada. (Bono, 2012).

2. Sujetos de estudio. El grupo de sujetos de estudio está comprendido por 18 (no importa que sean repetidas, ya que esta es la "n") madres lactantes contactadas por medio de contactos personales que cumplieron con los criterios de inclusión y que estuvieron dispuestas a participar voluntariamente en el estudio. Se utilizó una muestra de seis madres para la fase piloto, dos de ellas decidieron voluntariamente participar en la fase definitiva. Por lo que únicamente se reclutaron 10 madres más.

3. Contexto de la investigación. El trabajo de campo de la investigación se llevó a cabo en ocho semanas, en las cuales se realizó el reclutamiento, la toma de muestras y análisis de muestras, en el proceso participarán la asesora Dra. Mónica Orozco, la investigadora Gabriela Argueta estudiante de nutrición, y el Dr. Noel Solomons, Director Científico de CeSSIAM.

4. Tipo de muestreo. Se utilizó muestreo no probabilístico por conveniencia, debido a los costos elevados de realizar el análisis a una población representativa. Se reclutaron las madres lactantes voluntarias anterior a las visitas para la toma de muestras de la fase piloto y de la fase definitiva por medio de contactos personales, vía electrónica, telefónico o personal. Para realizar el tamizaje de la fase piloto las madres fueron citadas en un domicilio particular en zona 7 de la ciudad Guatemala, para realizar este tamizaje se realizó una pequeña entrevista, con los datos de inclusión y exclusión. En la misma cita se firmó el consentimiento informado y proveyó toda la información necesaria para poder participar en este estudio. En la fase definitiva se siguió el mismo método de tamizaje, pero en esta ocasión la firma del consentimiento y divulgación de la información fueron realizadas en cada una de sus residencias por separado antes de iniciar los días de tratamiento.

Criterios de inclusión

- Madres lactantes mayores de 18 años.
- Madres lactantes con más de 15 días post parto.

Criterios de exclusión

- Madres no lactantes
- Madres lactantes con lesiones en los senos.
- Madres embarazadas.
- Madres lactantes que superen 12 meses de dar lactancia materna a su hijo.
- Madres lactantes con enfermedades crónicas como Diabetes Mellitus, Hipertensión Arterial, o infecciosas como tuberculosis y Virus de Inmunodeficiencia Humana
- Madres intolerantes al gluten.
- Madres que estén tomando medicamentos.

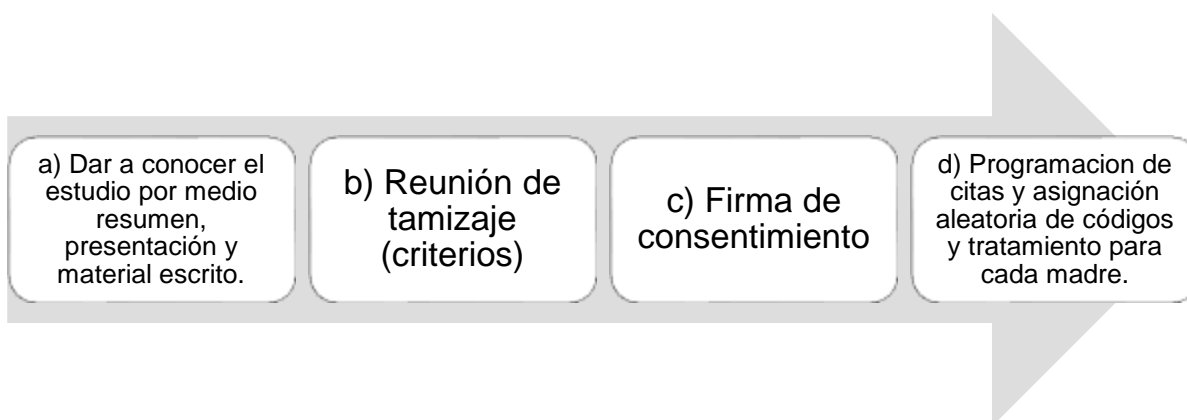
5. Aprobación ética. Para realizar esta investigación, fue necesario contar con la aprobación de dos comités de ética. Se presentó un protocolo para la aprobación del proyecto al comité estudios humanos de CESSIAM, en el cual se explicó en qué consistía el proyecto, el procedimiento a seguir, y se adjuntó un protocolo con un proceso similar a este proyecto. También se presentó un protocolo para la aprobación del estudio como trabajo de graduación, al comité de ética de la UVG. Se aprobó el estudio, ya que la participación de las madres, no podían en riesgo en ningún riesgo a la madre, ni al lactante. Los materiales utilizados para preparar la bebida, eran aptos para el consumo de madres lactantes, sin ningún riesgo que pudiera afectar el proceso de lactancia. Así mismo el lactante podía ser amamantado, aunque la madre estuviera participando en este estudio. Además se presentó un consentimiento informado para cada fase, con el cual la madre estuvo consciente de su participación voluntaria. Se agrega en el Apéndice 1 los puntos bioéticos que el comité de la UVG resaltó como indispensables para la aprobación del proyecto. (Apéndice 14).

6. Metodología.

a. Selección de la muestra y reclutamiento de las participantes. La muestra fue escogida por conveniencia, utilizando un tipo de muestreo no probabilístico. Se buscó el primer contacto con las madres por medio de contactos personales. Las madres lactantes, interesadas en participar en el estudio, fueron citadas un día específico para realizar el reclutamiento, incluyendo tamizaje y firma de consentimiento informado, siendo diferente para cada fase. En la etapa de reclutamiento se seleccionaron madres que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión. Para este fin, se realizó una entrevista informal, en donde se realizaron preguntas que incluían los criterios para participar en el estudio. Así mismo se adquirieron datos generales de la madre como: edad, paridad y fecha de nacimiento de su hijo lo que permitió determinar la edad del lactante. En esta misma sesión, se les informó a las participantes el objetivo del estudio, los beneficios, riesgos, y demás, antes de que firmaran el consentimiento informado específico para la fase en la que participarían. El consentimiento fue entregado a las participantes para que lo leyeran. En caso de ser analfabeta existió la opción de que un familiar pudiera leerlo para ella, y ella colocar su huella digital como firma, pero en esto no fue necesario, ya que todos los participantes fueron mujeres alfabetas.

Para la fase de definitiva, dos madres de la fase anterior, decidieron voluntariamente participar en esta fase. Se reclutaron únicamente 10 madres, para tener una muestra total de doce mujeres participantes. Se realizó el mismo proceso de reclutamiento, tamizaje, entrevista informal y firma del consentimiento informado. No fue necesario que las madres que habían participado en la fase piloto, pasaran por la entrevista informal, pero continuaron el proceso de firma de consentimiento informado para esta segunda fase. Se pueden observar el consentimiento informado para cada fase, y la guía para la entrevista informal realizada en los apéndices 6 y 7.

Figura 3. Procedimiento previo a fase experimental.
Reclutamiento y consentimiento informado



1) Colección de datos. Posterior a la firma del consentimiento informado, se efectuó la programación de citas y se le asignó aleatoriamente un código a la madre y cada uno de sus tratamientos y de esta forma asegurar el anonimato de la madre participante. En la fase piloto se asignó a cada una de las madres un código con la letra “P” seguido de un número de correlativo y el número de minutos del tiempo del tratamiento que se le sería asignado. Para identificar la muestra pre- tratamiento se cambió el número en minutos del tiempo, por 0. Se pueden observar los códigos en el Cuadro a continuación.

Cuadro 4. Descripción de códigos para cada sujeto en la fase piloto

| SUJETO Muestra pre-tratamiento | SUJETO Muestra post-tratamiento |
|--|---|
| P001-0 | P001-90 |
| P002-0 | P002-90 |
| P003-0 | P003-120 |
| P004-0 | P004-120 |
| P005-0 | P005-120 |
| P006-0 | P006-90 |

Así mismo en la fase definitiva posterior a la firma del consentimiento, a cada una de las madres le fue asignado un código con la letra M, un número de correlativo, seguido del 0 para identificar la muestra pre-tratamiento y 120/90 para identificar la muestra post tratamiento por último el código del tratamiento a tomar. A cada madre se le asignó aleatoriamente el tratamiento a recibir, A continuación se observa en el cuadro, la asignación aleatoria de los tratamientos, los códigos utilizados para cada tratamiento y se agrega un ejemplo de los códigos completos para la serie de 6 muestras de leche materna que cada madre proveyó.

Cuadro 5. Descripción de códigos y aleatorización para cada sujeto y orden de tratamientos a tomar.

| Código | DIA 1 | DIA 2 | DIA 3 |
|---------------|--------------|--------------|--------------|
| M008 | A | B | C |
| M009 | A | C | B |
| M0010 | B | A | C |
| M0011 | B | C | A |
| M0012 | C | A | B |
| M0013 | C | B | A |
| M0014 | A | B | C |
| M0015 | A | C | B |
| M0016 | B | A | C |
| M0017 | B | C | A |
| M0018 | C | A | B |
| M0019 | C | B | A |

*La letra A significa tratamiento de bebida con azúcar fortificada, la letra B significa tratamiento de bebida con azúcar sin fortificar, y la letra C significa tratamiento de azúcar fortificada y grasa.

Cuadro 6. Descripción de los tratamientos.

| Tratamiento No. 1 (TA1) Azúcar fortificada | Tratamiento No. 2: Azúcar no fortificada (Importada) |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Extracción de muestra de leche basal • Ingesta de 1 taza de bebida de cereales Morcaff® con 45g azúcar fortificada Caña Real® (3cdas) que contiene 450 µgµ de retinol. • Extracción de muestra de leche post-tratamiento | <ul style="list-style-type: none"> • Extracción de muestra de leche basal • Ingesta de 1 taza de bebida de cereales Morcaff® con 45 g (3 cdas) de azúcar no fortificada (azúcar extranjera Lantic®). • Extracción de muestra de leche post-tratamiento |
| <i>Tratamiento no. 3: Azúcar fortificada + 10 gramos de extracción basal</i> | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Extracción de muestra de leche basal • Ingesta de 1 taza de bebida de cereales Morcaff® con 45 g (3cdas) de azúcar fortificada Caña Real® y 10 gramos de grasa en forma de crema no láctea Poll®. (30 gramos /3 cdas). • Extracción de muestra de leche post-tratamiento | |

b. Entrega de tratamientos y toma de muestras para la prueba piloto. Posterior al reclutamiento, y asignación de códigos y tratamientos. Se citaron a las madres en grupos de cuatro y dos madres en el domicilio en zona 7 en dos días diferentes. Se les indicó a las madres que se presentaran en ayunas, para no interferir en los tratamientos. Se estableció que las 7:00 am era una hora adecuada para iniciar el estudio.

Las madres proporcionaron una muestra de leche materna antes de consumir el tratamiento y una después del tratamiento, ya sea 90 ó 120 minutos posteriores a la toma. Cada madre extrajo la muestra basal de leche de un solo seno, con una bomba de extracción manual. Se le pidió a la madre que vaciará el pecho, ya que se conoce que la composición de la leche cambia a lo largo de la mamada, también concentración de grasa va aumentando gradualmente. (Mayas y Martell, 1994) (Díaz-Arguelles, 2005). Aunque se motivó a la madre, a extraer toda la leche, no se tuvo un control sobre el vaciamiento del pecho. A tres madres se les extrajo una muestra basal y una muestra post-tratamiento luego de 90 minutos y a tres madres se les extrajo una muestra basal y una muestra post-tratamiento luego de 120 minutos.

Cada una de las seis madres lactantes consumió 45g de azúcar (450 µg retinol) Caña Real® en 250 ml de bebida a base de cereales Morcaff® a los que se le agregaron 10 gramos de grasa provenientes de 30 gramos/ 2 cdas de crema no láctea (Poll®). Se asumió que el azúcar cumplía con los requisitos de fortificación mínimos de aproximadamente 15 µg de RE/kg de azúcar. (Cadenas, 2008), por lo que se utilizaron 10 µg RE/ g para hacer los cálculos de la dosis de vitamina A de forma que los tratamientos aportaran a la madre aproximadamente 450 µg RE. Se agregó grasa, ya que se conoce que la grasa de la leche actúa como vehículo de las vitaminas liposolubles, y la vitamina A es una de ellas. (Riodan, 2009) Se utilizó la crema no láctea Poll®, ya que esta contiene 1 gramo de grasa por cada 3 gramos de polvo, y fue la fuente de grasa más viable de utilizar en un líquido caliente, para que la bebida tuviera buena aceptabilidad por las madres.

Inmediatamente después de terminar la bebida, se tomó el tiempo, 90 ó 120 minutos, dependiendo lo establecido con la madre. Durante el tiempo de espera, las madres recibieron información acerca de la importancia de la lactancia materna. (Apéndice 10) y tuvieron acceso a consumir agua pura, fresas o banano. Luego del esperar el tiempo prudente, se realizó la extracción final del mismo pecho.

Posterior a la intervención, el volumen de las muestras fue cuantificado utilizando una probeta (ml), y se almacenaron en botes de muestras de 50ml de propileno. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4°C, antes de ser alicuotadas para su análisis. Luego de ser alicuotadas en microtuboscónicos (Eppendorf) se mantuvieron en refrigeración durante 2 a 3 horas antes de ser congeladas, se congelaron por 1 semana, hasta que se obtuvieron las muestras completas de las 6 madres, todas las muestras fueron analizadas el mismo día. Las muestras se congelaron para facilidad del análisis, sustentado ya que estudios posteriores se demostró que no existe un cambio significativo en la concentración de vitamina A al congelar la leche materna (Whang, 2012). Para el análisis las muestras se descongelaron desde una noche antes, se homogenizaron en bolsas Ziploc® Sella fácil, para luego realizar una alícuota en tubos cónicos de 2ml y el resto se congeló nuevamente.

c. Entrega de tratamientos y toma de muestras para la Fase definitiva. En esta fase participaron doce madres reclutadas según el proceso descrito anteriormente, únicamente dos madres, decidieron participar en la fase piloto y definitiva. En el momento de ser reclutadas, se pidió a la madre que la última comida del día fuera a las antes de las 7:00 de la noche, para tener por lo menos 10 horas de ayuno, al momento de realizar la primera medición. Se pidió a cada madre que escogiera un pecho para extraer la muestra basal antes de que hubiera dado de mamar en por lo menos dos horas. Para la extracción se utilizaron extractores de leche manuales (medela), y cada madre señaló el momento en el que percibía que su pecho estaba vacío, aunque también la investigadora observó que al momento de hacer presión para la extracción, ya no se obtenía más muestra de leche. Se pidió a la madre que no amamantara con el pecho escogido hasta finalizar con el tratamiento de ese día.

Se visitaron los hogares de las participantes a la hora que junto con la participante, se estableció adecuada, para cada caso. Cada una de las participantes, fue asignada aleatoriamente a recibir un tratamiento en tres distintos días, logrando que al final cada una de las madres pudiera recibir los tres tratamientos. Los tratamientos se pueden observar en el Cuadro 6.

Posterior a cada extracción basal y post-tratamiento las muestras obtenidas por el extractor o tiraleche, fueron cuantificadas utilizando una probeta (ml), y se

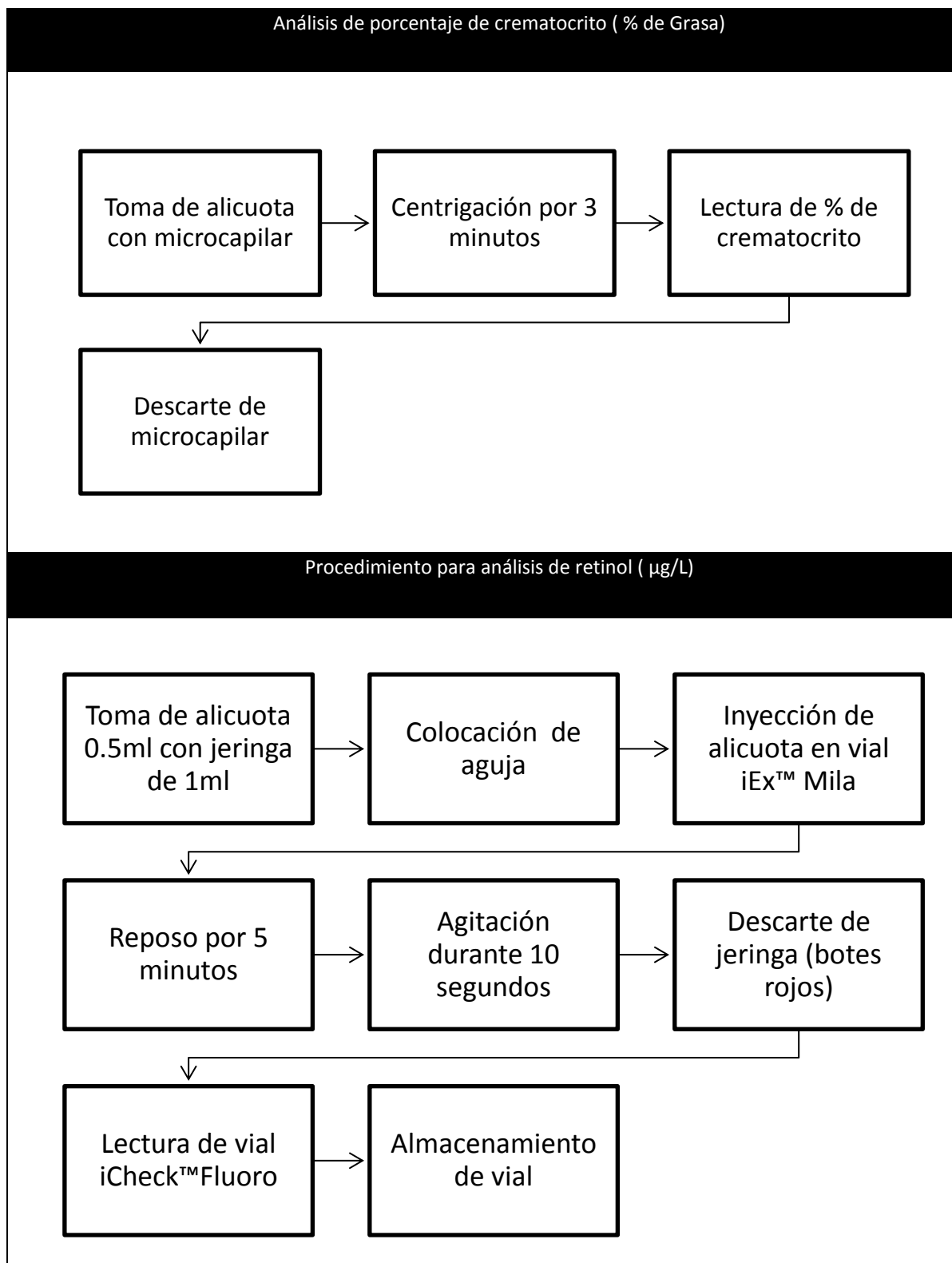
almacenaron en bolsitas Ziploc previamente codificadas. Las muestras fueron almacenadas en congelación para su posterior análisis.

d. Análisis de muestras

1) Determinación concentración de vitamina A. Se recolectaron 84 muestras de leche en total (12 fase piloto y 72 fase definitiva). Para realizar el análisis de la fase piloto, se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas en microtubos cónicos (2ml), y con microcapilares se tomaron muestras para el análisis de crematorito y del mismo tubo cónico se tomó una muestra de 0.5 ml con jeringas de 1ml, para cuantificar vitamina A con el fluorómetro iCheck™ Fluoro

Mientras que para el análisis de la fase definitiva, se descongelaron las muestras de leche que se habían colocado en bolsas Ziploc y directamente de las bolsas se tomaron las alícuotas. Se extrajo con el microcapilar la muestra para el análisis de crematocrito y con la jeringa de 1ml , se tomó la muestra de 0.5ml para la cuantificación de de vitamina A con fluorómetro iCheck™ Fluoro

Figura 4. Pasos procedimiento de análisis de Porcentaje de crematocrito y Retinol



Todas las jeringas y desechos derivados fueron descartados en botes de peligro biológico color rojo y entregada a la empresa Eco termo para su manejo adecuado. Todas las muestras de leche materna sobrante fueron almacenadas en congelación, en caso fuera necesario repetir alguna medición. Para el análisis de las muestras se siguió el siguiente procedimiento:

2) Determinación de concentración de grasa por medio de crematocrito. Se tomó una alícuota de cada una de las muestras con un microcapilar. Se utilizó plastilina Play doh®, para tapar una de los orificios del capilar. Se colocaron los capilares, numerados para su posterior identificación en una microcentrifuga, por 3 minutos, en ocasiones se tuvo que utilizar 1 minuto más, para lograr la separación. Posterior a la separación de la crema, se utilizó un lector de crematocrito, para realizar la lectura en porcentaje. Luego el porcentaje de grasa de la muestra de leche se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Grasa (g/L)} = (\text{Crematocrito (\%)} - 0.59)/0.146 \text{ (Lucas y cols, 1978).}$$

Esto resulta en la cantidad de grasa en gramos por litro de cada muestra.

3) Cálculos para la corrección de vitamina A con % de grasa. Debido a que comparaciones entre distintas mediciones de vitamina A han sugerido que la corrección con grasa de las muestra de leche materna pueden proveer mejores resultados. (Tanumihardjo, 2010), entonces se hizo la corrección de la concentración de retinol. Para esto se dividieron los $\mu\text{g/L}$ entre los gramos de grasa por litro obtenidos. Al realizar este cálculo se obtuvo los μg por gramo de grasa en la leche.

7. Análisis estadístico de datos

a. Piloto. No se utilizó estadística paramétrica, debido a que los datos no se ajustaban al parámetro normal. Únicamente se realizó estadística descriptiva. Se calculó un promedio de las lecturas de Vitamina A hechas en triplicado y este dato fue tomado como el valor de $\mu\text{g/L}$ (Vitamina A) de cada madre. Adicional a esto se determino el porcentaje de grasa. Se normalizó la concentración de $\mu\text{g/L}$, en relación el contenido de grasa (% grasa). (Lucas, 1978).

Con ayuda de Excel 2010, se elaboraron gráficas, de cada uno de los tratamientos que se les dio a las 6 madres. Y se compararon los datos, para establecer el tiempo apropiado para la fase definitiva.

b. Definitiva. Para el análisis estadístico de la fase definitiva se utilizó el programa SPSS Statistics Base 22.0 y el complemento de Excel de análisis de datos. Se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk, ya que el grupo era únicamente de doce madres. En la prueba se obtuvo valores mayores a 0.05 por lo que se asumió que los datos siguen una distribución normal.

Posterior a esto, se llevó a cabo una prueba t de Student apareada para conocer si existía un cambio significativo en la concentración de vitamina A, antes y después de hacer cada uno de los tres tratamientos: ingesta de azúcar fortificada con vitamina A (A1), ingesta de azúcar sin fortificar (A2), ingesta de azúcar fortificada con vitamina y grasa (G). También se efectuó una prueba t de Student para conocer si existía una diferencia significativa entre el porcentaje de grasa inicial y el porcentaje de grasa basal.

Luego se corrió un análisis de homogeneidad de varianzas, y se obtuvo un valor de significancia mayor a 0.05, por lo que se asumen varianzas desiguales. Posteriormente se efectuó un análisis de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y una prueba de esfericidad. En seguida se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas), para determinar si existía una diferencia significativa entre las concentraciones de vitamina A de los distintos tratamientos tomando en cuenta que los tres tratamientos se aplican a los mismos sujetos. Este tipo de análisis se utilizó porque permite la comparación simultánea de las diferencias con un nivel de significancia fijo, haciendo pasar a cada sujeto por las tres condiciones definidas, así podemos eliminar la variación residual debido a que se utilizaron los mismos sujetos. Para evitar el error de arrastre, las intervenciones se ejecutaron dejando un día entre cada condición, para que no existan efectos restantes de la intervención anterior. Se corrió la misma prueba de medidas repetidas para comparar la media de la concentración de retinol normalizado por grasa y del porcentaje de grasa de cada uno de los tres tratamientos.

VII. RESULTADOS

A. Fase piloto

El capítulo se divide en dos partes, la primera muestra los resultados de la fase piloto, en la cual se participaron seis madres lactantes. Las madres ingirieron una bebida con 45 gramos de azúcar y 30 gramos de crema no láctea. Se realizó una extracción de leche materna, previo a la ingesta del tratamiento, y una muestra posterior a la ingesta. Tres madres, se seleccionaron aleatoriamente para extraer la muestra 90 minutos post- tratamiento y tres madres 120 minutos post-tratamiento. Los resultados de la fase piloto únicamente proveyeron la orientación, para poder realizar la siguiente fase.

Cuadro 7. Descripción de madres lactantes (n=6) participantes del estudio para la fase piloto.

| TRATAMIENTO | MEDIA | MEDIANA | DE (±) | RANGO |
|----------------------------------|-------|---------|--------|---------|
| Edad madre (años) | 29 | 28 | 6 | 26/33 |
| Peso (lbs.) | 123 | 120 | 17 | 125/175 |
| Talla (cms) | 159 | 159 | 6 | 155/170 |
| IMC (kg/mts ²) | 25 | 25 | 3 | 22/28 |
| Paridad (número de hijos) | 2 | 2 | 1 | 1/3 |
| Edad lactante reportada (meses) | 4 | 4.5 | 3 | 1/9 |
| Edad lactante calculada* (meses) | 4 | 4.5 | 3 | 1/9 |

*La edad del lactante se calculó en meses utilizando la siguiente fórmula en una hoja de Excel :=(SIFECHA(A,B,"m"). Siendo A la fecha de nacimiento, B la fecha de la entrevista y "m" para meses.

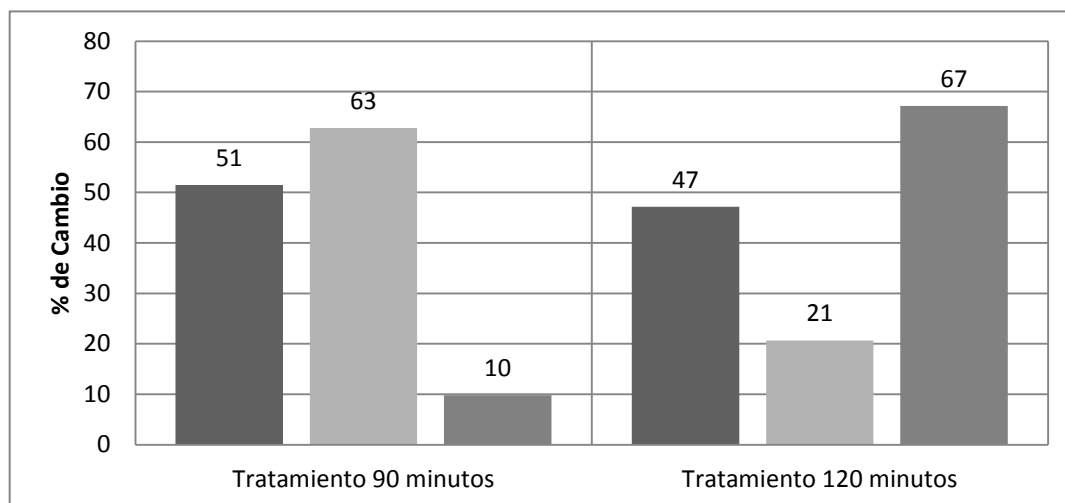
En el Cuadro 6 se observan los datos de las madres que participaron en la fase piloto. Se resalta como dato interesante que la edad reportada por las madres y la edad calculada por medio de la fórmula de Excel, es exacta. Se resalta esto, ya que empíricamente se conoce que las madres suelen realizar cálculos erróneos de la edad en meses de los lactantes.

En el Cuadro no. 7 se puede observar los valores de retinol separados por el tiempo de espera post-tratamiento. Se puede observar que el promedio de retinol final en el tratamiento de los 90 minutos es mayor, que el promedio final a los 120 minutos. Así mismo se observa un cambio de retinol mayor a los 90 minutos.

Cuadro 8. Concentraciones de retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de madres lactantes ($n=6$) participantes de la fase piloto en tratamientos 90 y 120 minutos. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango.

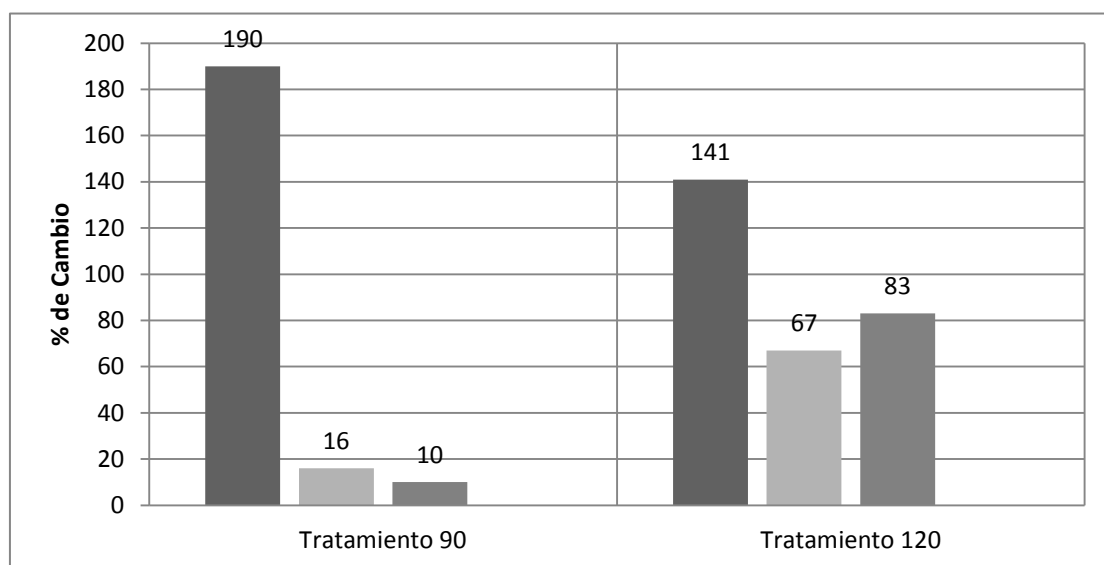
| Media \pm DE Mediana (Min-Max) | Tratamiento 90 minutos (n=3) | Tratamiento 120 minutos(n=3) |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| Retinol Basal ($\mu\text{g/L}$) | 451 \pm 223 350 (243/759) | 407 \pm 256 293 (166/761) |
| Retinol Final ($\mu\text{g/L}$) | 827 \pm 264 957 (459/1065) | 631 \pm 164 603 (446/844) |
| Cambio de Retinol($\mu\text{g/L}$) | 376 \pm 239 217 (198/715) | 225 \pm 101 280 (83/311) |

Figura 5. Porcentaje de cambio de retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de leche materna, post- tratamiento 90 y 120 minutos en la fase piloto.



En la Figura 5 se puede observar los porcentajes de cambio de la concentración de retinol, de las tres madres que participaron en la fase piloto. En la figura se puede comparar las tendencias de cambio de los dos tratamientos, 90 minutos post-tratamiento y 120 minutos pos-tratamiento. Se observa aumento en los dos tratamientos, pero se observan dos valores altos en el tratamiento de 90 minutos (51,63), lo que sugiere elegir este tratamiento para la siguiente fase.

Figura 6. Porcentaje de cambio de retinol normalizado con el porcentaje de grasa. (μg por gramo de grasa) post tratamiento de madres lactantes participantes en la fase piloto (n=6), Datos presentados en porcentaje, dividido en post-tratamiento 90 minutos y post-tratamiento 120 minutos.



En la Figura 6. Se puede observar el porcentaje de cambio de retinol, pero a diferencia de la gráfica anterior, estos valores están normalizados por los valores de grasa encontrados en las muestras. En esta figura se observa que a los 90 minutos se obtiene un solo pico alto de aumento, aunque bastante pronunciado, mientras que a los 120 minutos post-tratamiento se observan cambios de retinol más estables. Sin embargo, 90 minutos fueron escogidos como tiempo de espera post-tratamiento para la fase definitiva, tomando en cuenta el pico pronunciado de cambio y una menor exposición de los sujetos y lactantes.

B. Fase definitiva

La segunda parte, muestra los resultados de la fase piloto, en la cual participaron doce madres lactantes, durante tres días no consecutivos. En cada día se tomó una muestra de leche materna basal y una muestra post-tratamiento. Se tomaron tres tratamientos diferentes, en la sección de metodología se puede observar la aleatorización y la descripción de cada tratamiento. En la fase definitiva no se obtuvieron los resultados esperados que comprobaran las hipótesis. Se observa que en los cuadros donde se describen los valores de las pruebas estadísticas no encontramos valores significativos, por lo cual se puede decir que ninguno de los tratamientos provistos a las madres, tiene sobre la cantidad de retinol de la leche materna de las madres. Sin embargo en las gráficas podemos observar que existen algunas tendencias.

Por último se puede observar un cuadro con los valores de retinol contenido en las muestras de azúcar provistas a las madres para los tratamientos, en la fase piloto y fase definitiva. Este análisis se hizo post-hoc, y muestra valores inferiores a los esperados. A continuación, se puede observar las gráficas y cuadros de cada una de las fases y el análisis post-hoc de las muestras de azúcar.

Cuadro 9. Descripción de madres lactantes (n=12) participantes del estudio para la fase definitiva.

| TRATAMIENTO | MEDIA | MEDIANA | DE | RANGO |
|----------------------------------|--------------|----------------|------------|--------------|
| | | | (±) | |
| Edad (años) | 29 | 29 | 5 | 23/40 |
| Peso (lbs.) | 131 | 124 | 26 | 102/193 |
| Talla (cms) | 159 | 159 | 6 | 145/168 |
| IMC (kg/mts ²) | 23 | 23 | 4 | 17/32 |
| Paridad (no. de hijos) | 1.5 | 1 | 1 | 1/3 |
| Edad lactante reportada (meses) | 6.4 | 6.5 | 4 | 1/11 |
| Edad lactante calculada* (meses) | 6.5 | 6.5 | 4 | 2/11 |

*La edad del lactante se calculó en meses utilizando la siguiente fórmula en Excel: =(SIFECHA(A,B,"m"). Siendo A la fecha de nacimiento, B la fecha de la entrevista y "m" para meses.

En el siguiente cuadro se observan los datos de retinol ($\mu\text{g/L}$) de las muestras de leche las madres que recibieron los tres tratamientos. También se presentan los resultados de las pruebas t de Student llevadas a cabo, para conocer si existía alguna diferencia entre las medias de retinol basal y retinol final cuantificado en las muestras extraídas en cada tratamiento. No se encontró diferencia significativa entre los el valor de retinol basal y final en ninguno de los tres tratamientos. También se puede observar los resultados de la prueba ANOVA de medidas repetidas corregido por Greenhouse-Geisser para conocer si existía alguna diferencia significativa entre lasmedias de los tres tratamientos, en los valores iniciales, final y en el cambio de concentración post tratamiento. En ninguna de las pruebas se encontraron diferencias significativas para el Retinol ($\mu\text{g/L}$).

Cuadro 10. Concentraciones de retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de leche materna de madres ($n=12$) que consumieron los tres tratamientos de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango

| Tratamientos | | | | |
|--|---|---|---|---|
| Media \pm DE Mediana (Min-Max) | Azúcar sin Fortificar | Azúcar Fortificada | AzúcarFortificada – Grasa | Valores p (Tratamiento) ² |
| Retinol Basal ($\mu\text{g/L}$) | 684 \pm 451 478 (238/1832) (a) | 509 \pm 200 527 (221/791) (a) | 620 \pm 228 592 (327/1050) (a) | $p=0.309$ |
| Retinol Final ($\mu\text{g/L}$) | 711 \pm 219 697 (355/1056) (a) | 606 \pm 203 521 (340/1016) (a) | 714 \pm 246 711 (308/1157) (a) | $p=0.234$ |
| Valores p (tiempo) ¹ | $p= 0.41$ | $p= 0.11$ | $p= 0.14$ | |
| Cambio retinol($\mu\text{g/L}$) | 29 \pm 432 100 (-1044/525) (a) | 97 \pm 269 72 (-421/490) (a) | 94 \pm 286 60 (238/1832) (a) | $p= 0.843$ |

¹T de Student pareado: No se encontró diferencia significativa entre los el valor de retinol basal y final en ninguno de los tres tratamientos.

²ANOVA medidas repetidas corregido con prueba Greenhouse-Geisser. Las letras en paréntesis representan la comparación de ANOVA de medidas repetidas, las letras iguales representan valores sin diferencia estadísticamente significativa.

En el Cuadro 10 se observan los valores de retinol normalizado con el porcentaje de grasa y los resultados de las pruebas t de Student llevadas a cabo, para conocer si

existía alguna diferencia entre las medias de retinol normalizado basal y retinol normalizado final cuantificado en la muestras extraídas en cada tratamiento. También se pueden observar los resultados de la prueba ANOVA de medidas repetidas corregido por Greenhouse-Geisser, para conocer si existía alguna diferencia significativa entre las medias de los tres tratamientos, en los valores iniciales de retinol normalizado, valores finales de retinol normalizado y en el cambio de concentración de retinol normalizado post tratamiento. Con esta prueba se observa que se encontró una diferencia significativa entre los valores iniciales de retinol normalizado entre los tres tratamientos. Pero no se pudo identificar por medio de una prueba post hoc cual es el tratamiento que provoca la diferencia significativa.

Cuadro 11. Concentraciones de retinol normalizado por el porcentaje de grasa (μgRE por gramo de grasa) de muestras de leche materna de madres ($n=12$) que consumieron los tres tratamientos de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango.

| Tratamientos | | | | |
|---|---|--|---|--|
| Media\pmDE Mediana (Rango) | Azúcar sin Fortificar (N=12) | Azúcar Fortificada (N=12) | AzúcarFortificada - Grasa (N=12) | Valores p Tratamiento² |
| Retinol Normalizado Basal($\mu\text{g g/g}$ de grasa) | 17 \pm 6 18 (8/26) (b) | 13 \pm 5 12 (7/21) (b) | 13 \pm 5 14 (7/20) (b) | P=0.038 |
| Retinol Normalizado Final ($\mu\text{g g/g}$ de grasa) | 15 \pm 6 15 (6/22) (a) | 13 \pm 4 13 (9/22) (a) | 14 \pm 5 14 (6/20) (a) | P=0.474 |
| Valores p por tiempo¹ | <i>p= 0.06</i> | <i>p= 0.32</i> | <i>p= 0.41</i> | |
| Cambio Retinol Normalizado ($\mu\text{g g/g}$ de grasa) | -2 \pm 5 -2 (-17/3) (a) | 1 \pm 4 2 (-9/7) (a) | 0 \pm 3 0 (-7/4) (a) | P=0.283 |

¹T de Student pareado: No se encontró diferencia significativa entre los el valor de retinol basal y final en ninguno de los tres tratamientos.

²ANOVA medidas repetidas corregido con prueba Greenhouse-Geisser. Las letras en paréntesis representan la comparación de ANOVA de medidas repetidas, las letras diferentes representan los valores estadísticamente diferentes.

Se encontró una diferencia en la concentración de retinol normalizado en la línea basal. No se encontró diferencias significativas de concentración final y del cambio de

retinol normalizado entre los tres tratamientos ni en el cambio de concentración entre tratamientos.

En el Cuadro 11 se muestran los datos del porcentaje de grasa y su estadística descriptiva, así como los resultados de las pruebas t de Student realizadas para conocer si existía una diferencia significativa entre los valores de grasa como porcentaje para cada uno de los tratamientos. En este caso se observa una diferencia significativa entre el valor basal de porcentaje de grasa y el valor final para el tratamiento en el cual las madres recibieron la bebida con azúcar sin fortificar, también se encontró la misma diferencia significativa para el valor de porcentaje de grasa para el tratamiento en el cual las madres recibieron azúcar fortificada y grasa. En cuanto la comparación por medio de ANOVA de medidas repetidas corregido por Greenhouse-Geisser para los tres tratamientos no se encontró ninguna diferencia significativa para la grasa.

Cuadro 12. Porcentaje de grasa (g/L) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango

| Tratamientos | | | | |
|--|---|--|--|--|
| Media\pmDE Mediana (Min-Max) | Azúcar sin Fortificar (N=12) | Azúcar Fortificada (N=12) | Azúcar Fortificada - Grasa (N=12) | Valores p tratamiento² |
| % de grasa basal (g/L) | 39 \pm 25* 37 (10/85) | 37 \pm 16 37 (11/64) | 45 \pm 20** 44 (10/78) | P=0.288 |
| % de grasa final (g/L) | 48 \pm 21* 48 (10/92) | 44 \pm 27 37 (9/106) | 52 \pm 22** 51 (8/99) | P=0.503 |
| Valores p por tiempo¹ | *p=0.04 | p= 0.15 | **p= 0.02 | |
| Cambio % de grasa | 9 \pm 4 10 (0/7) | 7 \pm 11 0 (-2/42) | 7 \pm 11 4 (-7/28) | P=0.860 |

¹T de Student pareado: Si se encontró diferencia significativa* entre los valores de grasa basal y final del tratamiento con azúcar sin fortificar y **el tratamiento con azúcar fortificada y grasa.

²ANOVA medidas repetidas corregido con prueba Greenhouse-Geisser. No se encontró diferencias significativas entre los tres tratamientos, ni en la media del cambio de concentración entre tratamientos.

Cuadro 13. Volúmenes (ml) de muestras de leche materna de madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos de estudio. Datos se presentan como promedios \pm desviación estándar, mediana y rango.

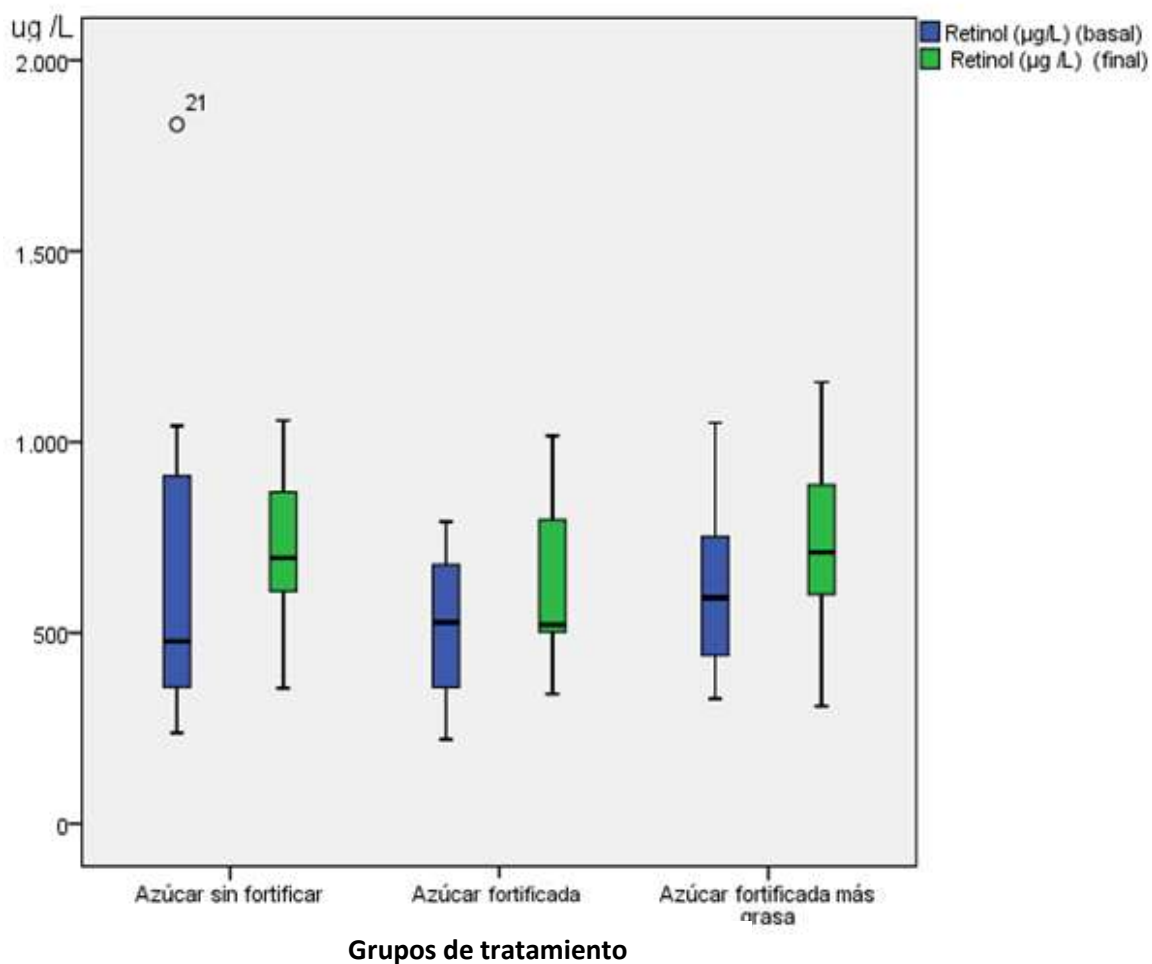
| Tratamientos | | | | |
|--|------------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| Media \pm DE Mediana (Min-Max) | Azúcar sin Fortificar (N=12) | Azúcar Fortificada (N=12) | AzúcarFortificada – Grasa (N=12) | Valores p tratamiento ² |
| Volumen de leche inicial (ml) | 43 \pm 17 38 (25/75) | 43 \pm 20 30 (25/90) | 47 \pm 22 38 (30/100) | P=0.679 |
| Volumen de leche final (ml) | 36 \pm 14 30 (30/70) | 38 \pm 15 30 (30/75) | 37 \pm 11 30 (25/60) | P=0.830 |
| Valores p por tiempo ¹ | $p= 0.02^*$ | $p= 0.02^*$ | $p= 0.03^{**}$ | |
| Cambio del volumen de leche | -6 \pm 11 -3 (-30/10) | -5 \pm 20 0 (-30/30) | -5 \pm 17 -5 (-40/20) | P=0.704 |

¹T de Student pareado: Si se encontró diferencia significativa entre los valores de grasa basal y final de los tres tratamientos.

²ANOVA medidas repetidas corregido con prueba Greenhouse-Geisser. No se encontró diferencias significativas entre los tres tratamientos. , ni en la media del cambio de concentración entre tratamientos.

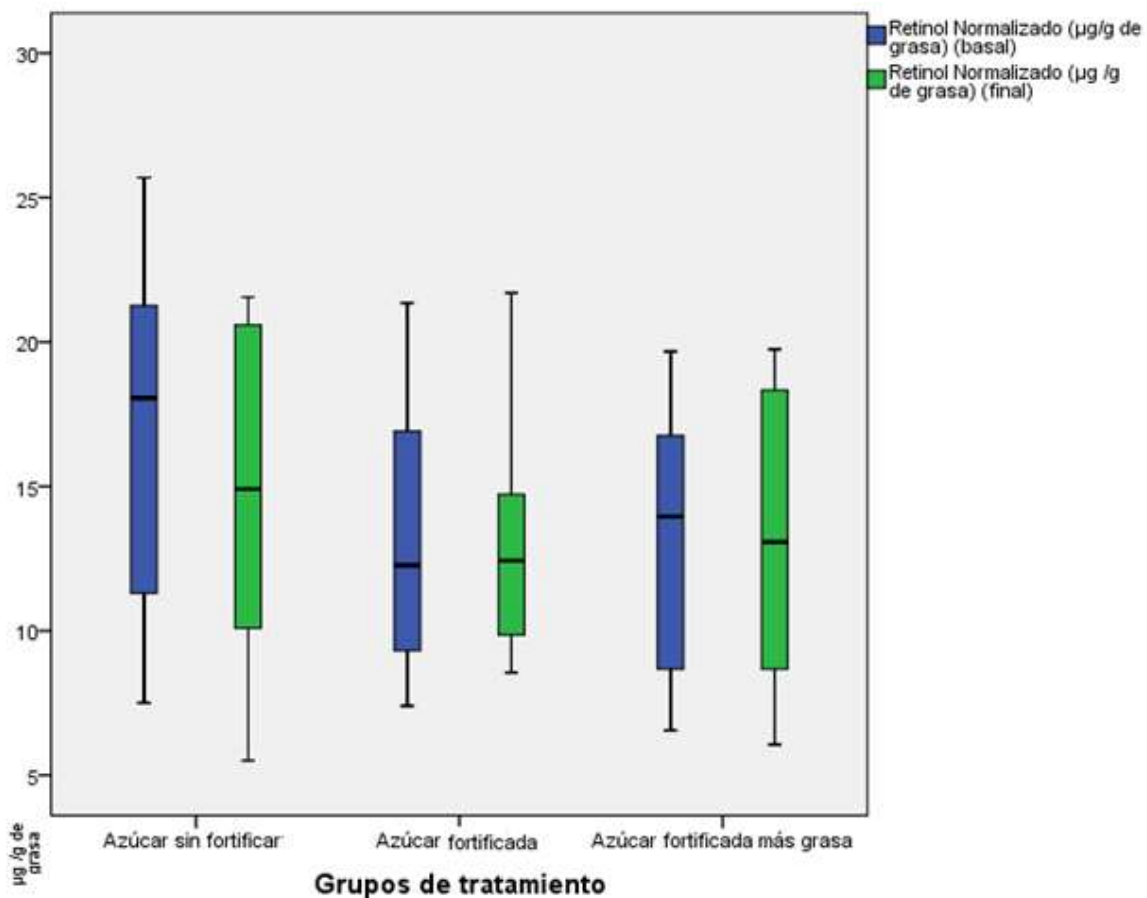
En la Figura 7, se presenta la media de la concentración de retinol inicial y la media de la concentración basal para cada tratamiento. Se puede observar un aumento en la concentración final luego de que la madre consume cada uno de los tratamientos. En esta Figura se observa los valores de error estándar positivos.

Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes de retinol ($\mu\text{g/L}$) de muestras de leche materna de madres ($n=12$) que consumieron los tres tratamientos de estudio.



Se puede observar en el gráfico anterior un diagrama de cajas y bigotes para la concentración retinol, se observan los valores iniciales y finales de cada uno de los tres tratamientos. En este diagrama se observa que existe un valor atípico en el tratamiento de azúcar sin fortificar.

Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes retinol ($\mu\text{g} / \text{g}$ de grasa) de muestras de leche materna de madres ($n=12$) que consumieron los tres tratamientos de estudio.



Se puede observar en el gráfico anterior un diagrama de cajas y bigotes para la concentración de retinol, se observan los valores iniciales y finales de cada uno de los tres tratamientos. En este diagrama se puede observar que existe una mayor dispersión de los datos de retinol normalizado para el tratamiento de azúcar sin fortificar.

En la Figura 9 se puede observar el porcentaje de cambio de retinol para los tres tratamientos. Se tuvo un porcentaje de cambio más alto, en el tratamiento en el cual las madres consumieron la bebida de cereales únicamente con azúcar fortificada, luego se encuentra el tratamiento de azúcar fortificada más grasa, y por último se observa que el

tratamiento en el cual se observó menos porcentaje de cambio fue el tratamiento en el cual las madres consumieron azúcar sin fortificar. En la parte superior de las barras se muestra el error estándar, nos muestra la misma tendencia de variación de los datos.

Figura 9. Porcentaje de cambio retinol ($\mu\text{g RE/L}$) entre el basal y el final en las muestras de leche de las madres ($n=12$) que consumieron los tres tratamientos. Datos presentados en porcentaje de $\mu\text{g /L}$ y error estándar.

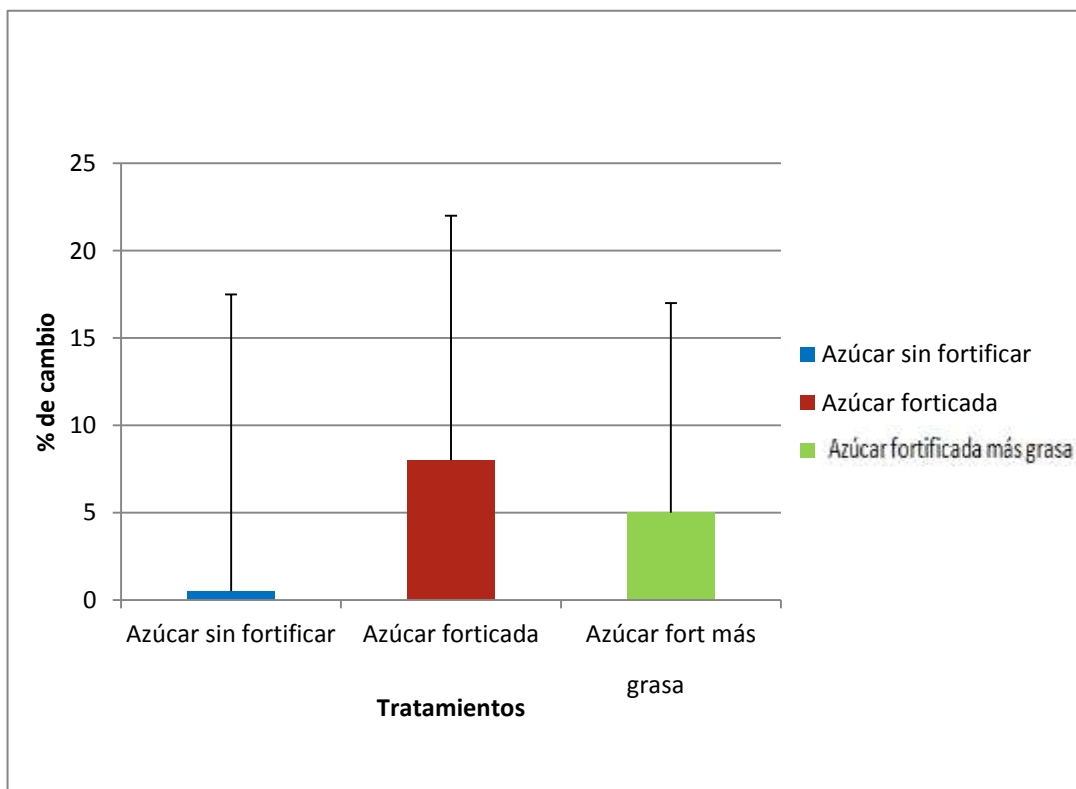
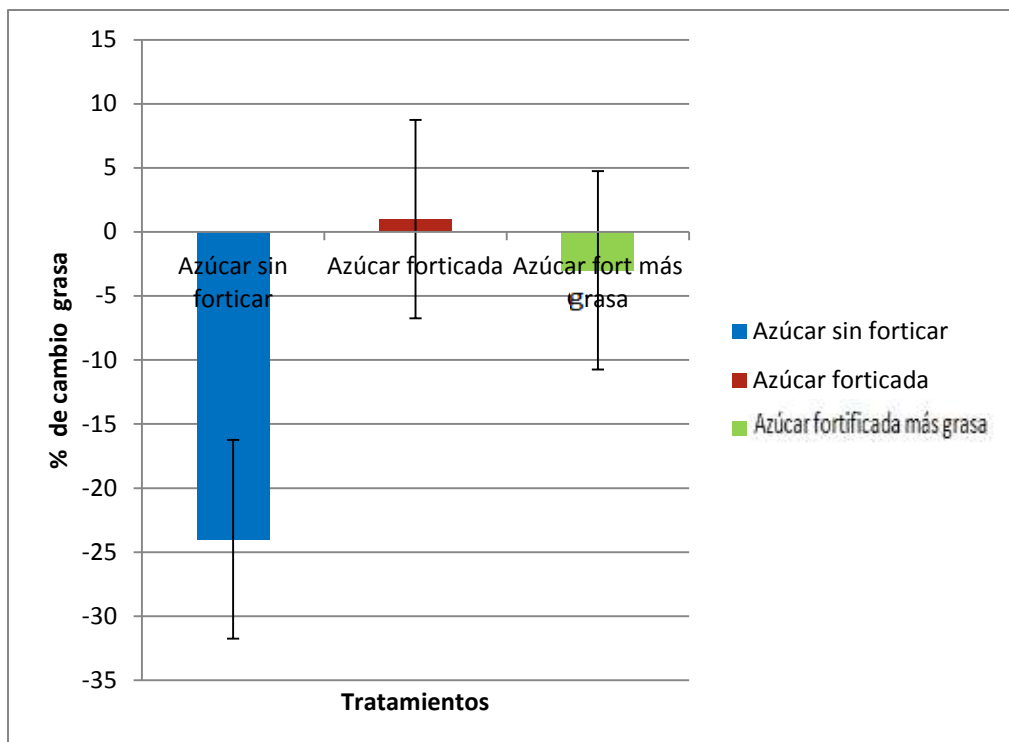
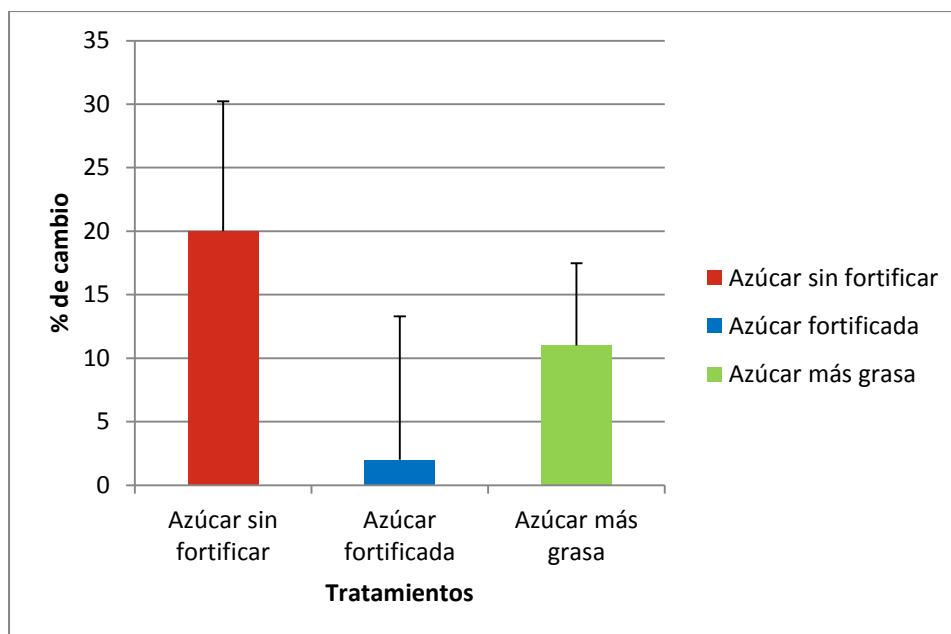


Figura 10. Porcentaje de cambio retinol (ug RE por gramo de grasa) entre el basal y el final en las muestras de leche de las madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos. Datos presentados en porcentaje de μg por gramo y error estándar.



En la Figura 10 se encontró una disminución de la concentración de retinol normalizado con grasa para el tratamiento en el cual la madres consumieron la bebida con azúcar sin fortificar, es por eso que el porcentaje de cambio, se encuentra graficado como negativo. Así mismo se encontró con un porcentaje de cambio negativo o disminución el tratamiento con azúcar fortificada más grasa. Ahora bien se encontró que el tratamiento que tuvo un porcentaje de cambio en dirección positiva, es decir un cambio positivo o aumento, fue en el cual la madres tomar la bebida de cereales con azúcar fortificada.

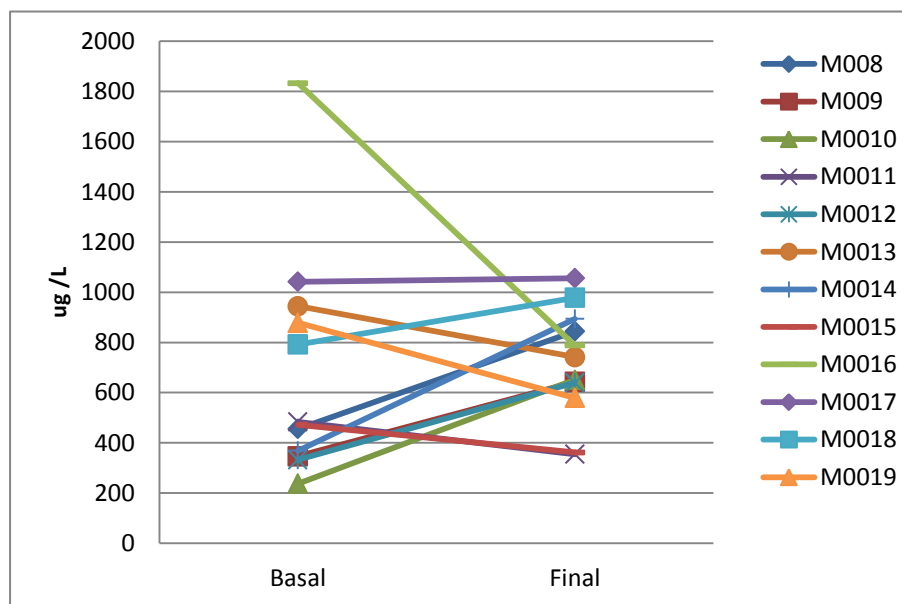
Figura 11. Porcentaje de cambio de gramos de grasa entre el basal y el final en las muestras de leche de las madres (n=12) que consumieron los tres tratamientos. Datos presentados en porcentaje de grasa y error estándar.



La Figura 11, nos muestra el porcentaje de cambio en el porcentaje de grasa en cada uno de los tratamientos. Se puede observar que el porcentaje de cambio mayor lo encontramos en el tratamiento de azúcar sin fortificar mencionar que fue negativo, luego el tratamiento de azúcar fortificada más grasa y por último el tratamiento en el cual se observó menos cambio fue el tratamiento en el cual la madres consumieron la bebida con azúcar fortificada. Las barras de error estándar muestra la misma tendencia de los datos.

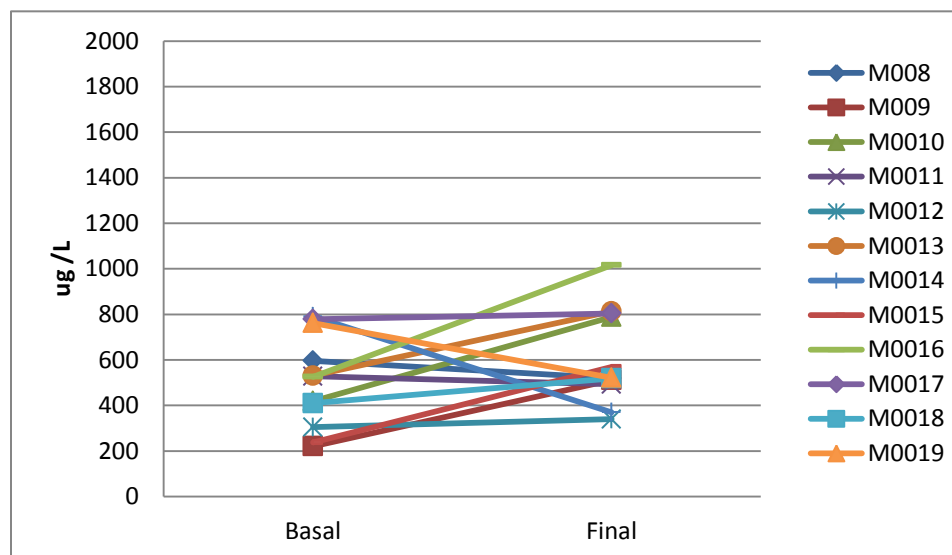
En la Figura 12 siguiente, se puede observar la tendencia de aumento o disminución de retinol, en el tratamiento de azúcar sin fortificar para cada una de las madres. Se observa claramente el valor atípico representado por la línea de tendencia de la madre M0016 color verde. Así mismo también se puede observar que seis madres presentan tendencia de aumento de vitamina A, cinco disminuyen su concentración de vitamina A y una madre mantiene sus valores.

Figura 12. Concentración de retinol basal ($\mu\text{g/L}$) y retinol post-tratamiento ($\mu\text{g/L}$) de cada madre lactante ($n=12$) participante del tratamiento de azúcar sin fortificar



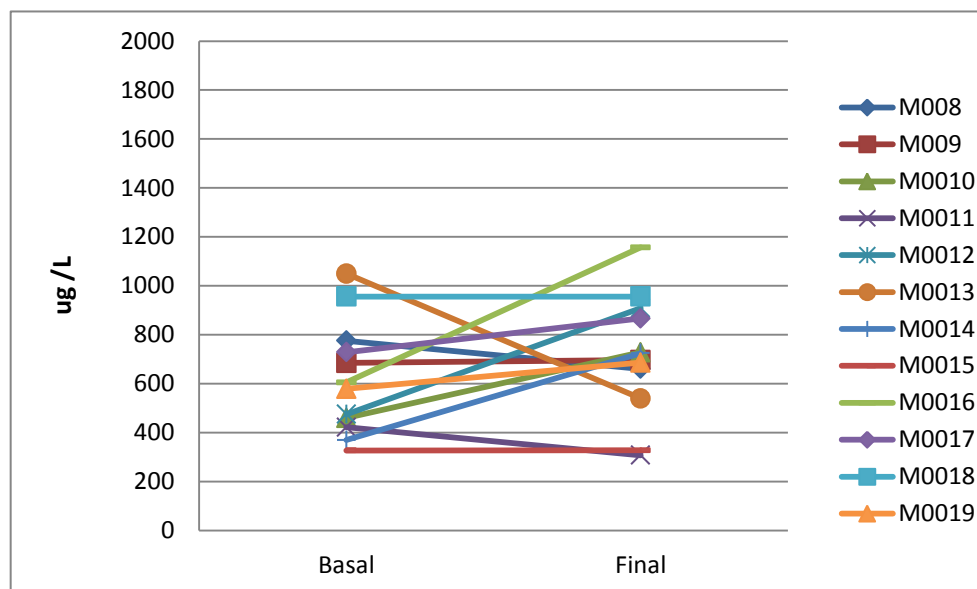
En la siguiente Figura, se puede observar la tendencia de concentración de retinol de cada madre, en esta los valores se encuentran un poco más cercanos, y se puede observar que ocho de doce madres tiene una tendencia de aumento de concentración de retinol.

Figura 13. Concentración de retinol basal ($\mu\text{g/L}$) y retinol post-tratamiento ($\mu\text{g/L}$) de cada madre lactante ($n=12$) participante del tratamiento de azúcar fortificada



En Figura 14 se observan las tendencias de la concentración de retinol para el tratamiento de azúcar fortificada más grasa. En este caso, se observa una tendencia de aumento en siete madres, tres disminuyeron y en el resto no se observó cambio.

Figura 14. Concentración de retinol basal ($\mu\text{g/L}$) y retinol post-tratamiento ($\mu\text{g/L}$) de cada madre lactante ($n=12$) participante del tratamiento de azúcar fortificada más grasa.



Para confirmar el contenido de vitamina A presente en las muestras de azúcar utilizadas en el estudio, se determinó el mismo en varias muestras del azúcar comercial. Los resultados se muestran a continuación:

Cuadro 14. Valores de retinol ($\mu\text{g/L}$ y $\mu\text{g/g}$) datos las 4 muestras de azúcar utilizadas para los tratamientos provistos a las madres. Datos son presentados como promedios.

| No. | | Lectura de Retinol ($\mu\text{g/L}$) | Retinol por gramo ($\mu\text{g/g}$) | Retinol por 45 gramos ($\mu\text{g RE-45g}$) |
|-----|---------------------------|--|---------------------------------------|--|
| 1 | Muestra 1 (fortificada) | 613 | 3.01 | 137,25 |
| 2 | Muestra 2 (fortificada) | 107 | 1.07 | 48,15 |
| 3 | Muestra 3 (fortificada) | 438 | 2.19 | 98,55 |
| 4 | Muestra 4 (fortificada) | 1131 | 5.65 | 252,9 |
| 5 | Muestra 5(Sin Fortificar) | 14 | 0.07 | 3,15 |

VIII. DISCUSIÓN

Desde 1940 se conoce evidencia del aumento en la concentración de vitamina A en la leche materna cuando la madre está expuesta a altas dosis de esta vitamina. (Ross, 2003) No obstante, estos estudios fueron realizados como seguimiento a programas de suplementación directa a la madre en largos periodos de tiempo, y no solamente a dosis únicas de vitamina A como lo que se pretendió observar en este estudio.

Los resultados de la fase piloto mostraron un aumento en la concentración de retinol, ($\mu\text{g/L}$), y retinol normalizado ($\mu\text{g RE}$ por gramos de grasa) al consumir 45 gramos de azúcar fortificada y 30 gramos de grasa a los 90 minutos post-dosis. (Cuadro.8 y figura. 5,6) Esta fue la razón por la que se decidió utilizar este tiempo de espera en la fase de intervención posterior. Aunque el retinol normalizado o corregido por grasa, no es un indicador para evaluar estatus o entrega de vitamina A, ayudó a conocer un poco más sobre la velocidad de transporte de esta vitamina hacia la glándula mamaria (Riodan, 2009). Se escogió el tratamiento de azúcar fortificada con grasa añadida para las pruebas en la fase piloto ya que en teoría la grasa mejora la biodisponibilidad de la vitamina A, aumentando su absorción en el intestino. Con este tratamiento se debería de ver la mayor respuesta posible en la leche.

En el momento de realizar la fase definitiva, se supuso que en ambos tiempos de espera existiría un aumento en la concentración de vitamina A post-dosis, y que 90 minutos era un tiempo de espera más prudente para las madres y los lactantes. No obstante, al observar detenidamente la Figura 6, se puede observar una tendencia, más estable de cambio de retinol normalizado a los 120 minutos y no a los 90 minutos. El tiempo de espera probablemente fue un factor que impidió encontrar una diferencia significativa de vitamina A en las muestras. Probablemente dos horas o 120 minutos después de la ingesta si existirían cambios significativos, ya que muchos valores, estuvieron bastante cerca de los límites de significancia.

En comparación con un estudio publicado en 1999, en el cual se buscó obtener orientación acerca de la cinética de absorción de los quilomicrones que, como se sabe, están formados por ésteres de retinol, retinol libre, y demás componentes. (Gil, 2010), se asumió que se el pico de aumento de vitamina A y grasa se produciría alrededor de

las 2 horas, por lo que se esperó que el aumento tendría que haber sucedido aún más rápido en las mujeres participantes de este estudio porque las madres que participaron en este estudio tuvieron características más favorables para obtener resultados significativos en el transporte de vitamina A y grasa, como menos peso y edad (Smith D, 1999) Las madres que participaron en este estudio, tuvieron características más favorables para obtener resultados significativos en el aumento de grasa y vitamina A ya que el estudio mencionado utilizó sujetos masculinos de alrededor de 100 kg de peso y una edad media de 48 años, aproximadamente dos veces el peso y de 15 a 10 años más que las mujeres lactantes objeto del presente estudio.

Aunque se esperaba encontrar cambios significativos, desafortunadamente, los resultados mostraron que no existe ningún cambio en la concentración de vitamina A como retinol al ingerir cualquiera de los tres tratamientos. (Ver Cuadro 10 y 11) Tampoco se observaron cambios significativos para el retinol corregido por la grasa, (ver Cuadro 12) que podrían haber apoyado la idea de los cambios de grasa que tiene la leche materna al inicio y final de la extracción pudieran haber afectado los resultados. (Sello, 1995).

Al comparar estadísticamente la cantidad de grasa contenida en la leche como porcentaje (Cuadro 12), si existió un cambio significativo en el porcentaje de grasa, antes y después de ingerir el tratamiento de azúcar sin fortificar y azúcar fortificada y grasa, más no para el tratamiento con únicamente azúcar fortificada. Por lo que probablemente el contenido de grasa si puede influir. Pero esta también se asocia con un intervalo del llenado de la mama muestreada, 30 minutos más de espera (120 minutos) para la primera recolección comparada con la segunda con un intervalo de llenado de la mama de solamente 90 minutos. Como lo describe la literatura la composición de la leche es fluctuante en una madre, cambia durante el día, al final he inicio de cada extracción. (Shellhor, 1995). El porcentaje de cambio que tuvo la grasa, pareciera que está asociado indirectamente, aunque es importante resaltar que esta tendencia podría estar asociada con el análisis de crematocrito y no con la fisiología de la leche, ya que al momento de homogenizar las muestras, mucha de la grasa se quedaba adherida a las paredes de las bolsas utilizadas para almacenar las muestras.

Los cambios aunque no significativamente estadísticos, dan una idea de la cinética de absorción y movilización del retinol hacia la glándula mamaria al ingerir azúcar fortificada y grasa. El retinol tiene un porcentaje de cambio positivo más grande en las

madres que consumieron únicamente azúcar fortificada, comparado con los otros dos tratamientos. (Figura 9) Seguido de este tratamiento, el consumo de azúcar fortificada y grasa, también tiene aumento, aunque no tan elevado como el anterior y como era de esperarse no hay un aumento en el porcentaje de cambio de retinol al ingerir azúcar sin fortificar. Ya que se espera que exista una relación directa entre el consumo de vitamina A y el aumento de retinol en la leche materna, y al no consumir a la vitamina se esperaba que los valores permanecieran o incluso disminuyeran. (Tanumihardjo, 2010). No se conoce exactamente por qué no existió una tendencia de aumento similar o igual entre el tratamiento de azúcar fortificada y grasa y azúcar fortificada, pero se pudo establecer que en 90 minutos, periodo corto de tiempo, 30 gramos de grasa en las condiciones de este estudio no mejoraran la cinética de la vitamina A en la leche materna.

Según una revisión de artículos, la dieta de la madre está asociada directamente con el contenido de vitamina A, este aspecto fue dejado fuera del estudio, debido a las horas de ayuno que se le requirió a la madre, pero hubiera sido importante completar el estudio, tomando en cuenta la ingesta de las últimas 24 horas antes de la participación de las madres en el estudio. (Tanumihardjo, 2010) (Ross, 2003) (Díaz-Arguelles, 2005) Al obtener estos datos, se podría establecer si existe alguna relación, y si se ve afectado directamente el contenido de retinol de las madres con el consumo previo a participar en el estudio.

El tiempo de llenado del pecho, es importante para cuantificar contenido de nutrientes en la leche materna, ya que el contenido de grasa por lo tanto de vitamina A al ser una vitamina liposoluble va aumentando gradualmente (Mayas y Martell, 1994). (Díaz-Arguelles, 2005). En este estudio, no se cuantificó el tiempo de llenado del pecho antes de tomar la primera muestra, y únicamente el tiempo posterior a la ingesta del tratamiento. Para la extracción de la primera muestra se conocía que por lo menos fueron dos horas de llenado del pecho, ya que fue un requisito, pero no se cuantificaron las horas exactas. Mientras que para todas las madres si se cuantificó hora y media o 120 minutos post-tratamiento. Por lo que el manejo del tiempo de espera pre y post tratamiento es un factor limitante en este estudio. Posiblemente pueden mejorar los resultados al estandarizar los tiempos de espera.

Aunque no fue un objetivo del estudio, se analizó el azúcar provisto a las madres, en las cuales se encontró que la concentración del azúcar utilizado en la suplementación estaba por debajo de la concentración establecida en el estudio, la cual es de 450µg /g, (Cuadro 13). La concentración de vitamina A en las muestras utilizadas en este estudio varió de 48 a 252 µg/g, lo cual ni si quiera se acerca a lo que se estipulaba entregar a las madres en el estudio. Esto es muy importante, porque además de los factores anteriores mencionados, este puede ser la razón por la cual no existieron cambios significativos de retinol en la leche materna. Probablemente al utilizar azúcar previamente cuantificada, y proveer exactamente la meta de 450µg /Kg se puedan establecer diferencias estadísticamente significativas. Para futuros estudios, sería recomendable tomar varias muestras de azúcar, homogeneizarlas y cuantificar su contenido de vitamina A antes de entregarla como tratamiento en un estudio. Esto es un indicativo también de la gran variabilidad en las muestras comercialmente disponibles de azúcar en el país.

El tamaño de la muestra, fue otra limitación muy importante en este estudio, que podría también ser motivo por el cual no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. El tamaño de la muestra fue únicamente doce madres por motivos de presupuesto, así como de la disponibilidad de tubos iEx™Mila para el estudio. De igual manera la escasa experiencia de extracción y manejo de muestras de leche materna de la investigadora, también pudieron afectar los resultados.

Aún con estas limitaciones, cabe mencionar que el análisis de las muestras, fue llevado a cabo eficaz y eficientemente, gracias al uso del instrumento espectrofluorómetro iCheck™Fluoro. Esto facilitó el análisis de las muestras y permitió asegurar una medición adecuada de los datos.

Con los datos de retinol obtenidos con esta metodología, se puede obtener información adicional en relación a la exposición de vitamina A de los lactantes proveniente de la lactancia materna que reciben. Esto es de vital importancia para determinar si esta exposición está dentro de los requerimientos nutricionales de esta vitamina y sobre todo, por debajo de los niveles de toxicidad de vitamina A recomendados para infantes de esta edad (600ug/día). Las concentraciones de retinol observadas en las muestras de las doce madres lactantes mostraron valores entre 509-

714 ug/L. Tomando en cuenta que el promedio de ingesta de leche materna de los infantes lactantes es de 800ml aproximadamente se puede establecer que los infantes mantienen una ingesta de 400ug/L a 571 µg /L. Esto se cálculo de la siguiente manera : $0.8L * 509 \mu\text{g} /L = 400 \mu\text{g}$ y $0.8L * 714 = 571 \mu\text{g}$. Se conoce que las ingestas adecuadas (AI) de retinol para infantes de 0 a 6 meses, son 400 µg y para infantes de 7 a 12 meses son 500 µg, valores que están por debajo del límite de toxicidad (UL) que son 600 µg/día para infantes de 0 a 12 meses de edad. (Institute of Medicine, 2001). Se puede suponer que los hijos de las madres participantes en el estudio, están recibiendo la cantidad de retinol, necesaria y adecuada, por medio de la lactancia materna. Cabe resaltar, que niños que estén recibiendo suplementos nutricionales con vitamina A, combinada con lactancia materna con estos niveles de retinol, podrían estar en riesgo de intoxicación, ya que los valores de vitamina A contenida en la lactancia materna se encuentra muy cerca del límite de toxicidad.

En general se considera que este estudio provee información importante para conocer las tendencias de cambio de la concentración de vitamina A al consumir azúcar fortificada con dicha vitamina y la practicidad del uso del iCheck™Fluoro, aunque está claro que se necesita mucho más trabajo adicional, antes de poder entender completamente la relación que existe entre la ingesta de azúcar fortificada y la concentración de vitamina A en la leche materna.

IX. CONCLUSIONES

1. El tiempo en el cual existe un incremento detectable en la concentración de vitamina A como retinol en la leche materna en respuesta a la ingesta de aproximadamente 450 μg /kg, fueron 90 y 120 minutos.
2. No existe ninguna diferencia significativa en el cambio de concentración de vitamina A en la leche, 90 minutos después de consumir una bebida de cereales con 45 gramos de azúcar sin fortificar, como era de esperarse.
3. No existe ninguna diferencia significativa en el cambio de concentración de vitamina A como retinol en la leche materna, 90 minutos después de consumir una bebida de cereales con azúcar fortificada (aproximadamente 450 μg /gramo). No obstante, se identificó un aumento en la concentración de retinol, que puede indicar una tendencia de aumento.
4. Se determinó que tampoco existe diferencia significativa en el cambio de concentración de vitamina A en la leche, 90 minutos después de consumir una bebida de cereales con 45 gramos de azúcar fortificada y grasa, que se supuso contenía aproximadamente 450 μg /g, pero en realidad con un análisis post hoc se demostró que los 45 gramos contenían entre 48 μg /g y 253 μg /g, entre la mitad y la décima parte del estándar de vitamina A para el azúcar fortificada. Aunque se presentó un incremento mínimo que fue menor que el tratamiento en el cual las madres ingirieron únicamente azúcar fortificada.
5. Se encontró que no existe una diferencia significativa entre la concentración de vitamina A en la leche materna madura, independiente de la ingesta de Vitamina A, en los tres distintos tratamientos: bebida de cereales con 45 gramos de azúcar fortificada, bebida de cereales con 45 gramos de azúcar fortificada y 10 gramos de grasa y bebida de cereales con 45 gramos de azúcar sin fortificar.
6. El tiempo de 90 minutos de espera post-tratamiento para el llenado del pecho, el tamaño de la muestra, y la concentración de retinol entre la mitad y la décima parte de los valores esperados en las muestras provistas a las madres, fueron los factores principales a los cuales se atribuye el hecho que no se detectó un efecto o cambio significativo del retinol en la leche materna.

X. RECOMENDACIONES

1. El tiempo post-tratamiento utilizado (90 minutos) mostró únicamente tendencias de cambio, por lo que se recomienda, aumentar el tiempo de espera post-tratamiento a dos horas (120 minutos) previo a la extracción final y contabilizar el tiempo que la madre espero sin dar de mamar antes de la extracción basal.
2. Es importante poder enriquecer este estudio con datos dietéticos de la madre, por lo que se recomienda, agregar una encuesta de recordatorio de 24 horas y poder establecer si existe alguna relación entre el aspecto dietético y la concentración de vitamina A.
3. Se recomienda establecer junto con la madre, el modo de extracción de la leche, previamente al muestreo.
4. Se recomienda descongelar las muestras por lo menos dos horas antes de tomar alícuotas y realizar el análisis de las muestras, para evitar que existan restos de hielo.
5. Se recomienda aumentar el número de la muestra, para aumentar la validez del estudio, así como la probabilidad de obtener resultados estadísticamente significativos.
6. El tiempo de espera de 90 minutos post-tratamiento únicamente mostro tendencias de cambio, por lo tanto se recomienda realizar un estudio similar, pero aumentado el tiempo de espera post-tratamiento a 120 minutos.
7. Se recomienda que para evitar la variación de retinol en los tratamientos entregados, se cuantifique previamente el azúcar a utilizar, de manera que se pueda conocer el dato exacto que la madre va a ingerir.
8. Para el análisis de las muestras utilizando el instrumento iCheck™Fluoro se recomienda trabajar en un cuarto oscuro, sin luz artificial o natural, así como realizar mediciones en triplicado, y mantener la gradilla enumerada para evitar confusiones en las mediciones. Para tener una mejor eficiencia se recomienda sacar del empaque previamente las jeringas y destapar las agujas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, Dewan, *et al.* 2010. «Effect of dietary fat supplementation during late pregnancy and first six months of lactation on maternal and infant vitamin A status in rural Bangladesh». *Journal of health popular nutrition. International Centre diarrhoeal.*[Bangladesh]. 4(1):333-342
- Arroyave G and Mejia L. 2010 «Five decades of vitamin A studies in the region of Central America an Panama». *Food Nutr Bull.* 31(1) 118-129.
- Arroyave, *et al.* 1981.«The Effect of vitamin A fortificationfortification of sugar on serum vitamin A levels of preschool Guatemalan children: a longitudinal evaluation». *American Journal of ClinicalNutrition.* 34(1) 41-49.
- Blázquez, María. 2003. *Fisiología de la lactancia.* Curso de Medicina Naturista. Págs. 3.
- Bono R. *et al.* 2012. *Diseños cuasi-experimentales y longitudinales.* Universidad de Barcelona. España.Pag.86
- Breastmilk: A critical source of vitamin A for infants and young children. 2001. Linkages Project. United States Agency for International Development (USAID) USA.8 págs.
- Britton C, *et al.* 2008. «Apoyo para la lactancia materna» *Biblioteca Cochrane Plus* [España].4(1):5-56
- Broche Regla, *et al.* 2011. «Factores socioculturales y psicológicos vinculados a la lactancia materna exclusiva.» *Revista Cubana de Medicina General Integral.* [Cuba] 27(2):254-260
- Cadenas, Carmen. 2008. *Evaluación de la presencia de vitamina “a” en azúcar expendida al menudeo en el departamento del progreso en áreas de mayor riesgo y exposición al calor.* Tesis de Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. 60 págs.
- Cameán Ana y Repetto Manuel. 2012. *Toxicología Alimentaria- Monografía.* Ediciones Díaz de Santos. 19 Págs.

- Dary, Omar. 1994. «Avances en el proceso de fortificación de azúcar con vitamina A en Centroamérica». *Boletín de la oficina sanitaria de Panamá*. 117(6):529-537.
- Díaz-Argüelles, Virginia. 2005 «Leche materna: evaluación nutricional en el recién nacido». *Revista Cubana de Pediatría*. [Cuba] 77(2):
- Fernández, Lucas y González Claudio. 2002. *Introducción al análisis instrumental*. Editorial Ariel. Barcelona.464 págs.
- Field, Andy. 2012. Repeated measures: issues with repeated measures designs. *Discovering Statistics.USA* .22.págs.
- Frey, Salomon. 2009. «Nutrition security for all». *Revista Nutriview*. [Germany] 4 (1):3-4
- Gil, Ángel. 2010. *Tratado de nutrición Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Editorial médica panamericana. 2da Edición. Sociedad Española de nutrición parenteral y enteral. ESPEN. España. 964 Págs.
- Gómez, José Luis. 2008. *Análisis de la repercusión de la ingesta dietética durante la lactancia sobre la composición de Vitaminas A y E y Ácidos grasos de la leche materna*. Tesis Universidad de Granada. Granada. Departamento de pediatría. 331 págs.
- Guamuch. ,M. *et al*. 2007. Manual para el monitoreo interno de la premezcla de azúcar con vitamina A. (Aseguramiento de calidad y control de la calidad). INCAP, UNICEF. págs. 35,
- Guayo, Joseya. 2004. Lactancia Materna. Universidad de Sevilla. España.Págs. 394.
- Haskell, Marjorie y Brown, Kenneth. 1999. «Maternal vitamin A nutriture and the vitamin A content of human milk». *Journal of mammary gland biology and neoplasia*.4 (3):243-257.
- Hernandez, M. *et al*. 1999.Tratado de Nutrición.Ediciones Días de Santos. España. Madrid. Págs. 1496.
- Institute of Medicine . 2001. Dietary Reference Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, DC. National Academies Press.

- Jordán I. 2004. Determinación de vitamina "A" en azúcar que se expende en el departamento de Chiquimula. Trabajo de Graduación. Universidad San Carlos de Guatemala. Págs-5.28.
- López, Laura. 2005. «Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de niveles de vitamina A en la leche materna. Su aplicación a una población rural de Argentina » *ALAN*. 55(2):140-143
- López, María. 1996. *Evaluación de prácticas de lactancia materna y destete*. Tesis de Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala 90 págs.
- Lucas, A, et al. 1978. «Crematocrit: Simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk» *British Medical Journal* [British] 1(10):1018-1020.
- Macías. Sara, et al. 2006. «Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia». *Archivos argentinos pediátricos*.104 (5):423-430
- Martínez, Carolina et al. 2009. Situación de los programas de fortificación de Alimentos: Guatemala 2008. CONAFOR, UNICEF, INCAP/OPS Guatemala. 12 Págs.
- Mayans. E y Martell M.1994. «Estimación del valor calórico de la leche materna mediante la técnica del crematocrito» *Revista Médica Uruguay*. [Uruguay] 10(1):160-164
- Moreira Evelio y García María. 1997. « Lactancia Materna y vitamina A» *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición*. [Cuba] 11(1)58-60
- Oliveira, Ana María y Marinho Helyde. 2010. «Determination of vitamin A in the milk of donor mothers from the human milk bank (hmb) in Manaus/AM: Effect of processing» *Acta Amazonica*. 40(1):59-64
- Product information iCheck™ Fluoro*. 2011. BioAnalyt. Germany 2 págs.
- Ribeiro, Karla, et al 2005. «The effect of processing on the Vitamin A content of human milk». *Jornal de Pediatria*. [Brasil] 81(1):61-64
- Riordan, Jan y Wambach Karen. 2009. *Breastfeeding and human lactation*. 4th ed. Jones and Barlett Publisher. India. Pág 128.

- Ross. Jay y Harvey Philip. 2003. «Contribution of breastfeeding to vitamin A nutrition of infants: a simulation model» *Bulletin of the World Health Organization*. 81(2):80-86.
- Sánchez J. *et al.* 2012. « Rapid Assessment of Sugar Fortification with Vitamin A using de iCheck™Fluoro method in Guatemala» Datos no publicados.
- Schweigert, Florian, *et al.* 2011. « A new test Kit's potential for the rapid analysis of vitamin A in human an cow milk» *Sight an life* 23(3) 18:22
- Shellhorn C y ValdésV. 1995. *Leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca*.Chile Ministerios de salud, UNICEF. págs. 30.
- Smith D, *et al.* 1999 «Post-prandial chylomicron response may be predicted by a single measurement of plasma apolipoprotein B48 in the fasting state. » *Eur J Clin Invest*. 29(3):204-9.
- Tanumihardjo SA. 2010. Biomarkers of vitamin A status: what do they mean? In: World Health Organization. *Report: Priorities in the assessment of vitamin A and iron status in populations, Panama City, Panama, 15–17*. Geneva, World Health Organization, 2012.
- Tanumihardjo, SA. Penniston KL. 2002. «Simplified methodology to determinate breast milk retinol concentrations.» *JLipidi Res*. 43(2):350-355
- Whang Christine. 2012. «Vitamin A content of human milk of lactating man-mayan women in the western highlands of Guatemala». *TuftsUniversity.CeSSIAM*. Datos no publicado.
- Zambo Z. 20132 *et al.* «Studies with the iCheck FLUORO Vitamin A Analyzer for application to the public health situation in Guatemala: Adaptation to realities of the simulated field setting Report from Guatemala: Mountng and Adaptation of fluorescent Rapid-Assay Device (iCheck™Fluoro) for Vitamin A in sugar an biological fluids» *Sight and life*. 2(1):72-73 *CESSIAM*.

XII. APÉNDICE

Apéndice 1: Aspectos bioéticos de importancia para el comité de ética de la Universidad del Valle.

- Cuasi-experimento. Se clasifica como tal debido que la asignación aleatoria de la muestras que se utilizaran no es posible, pero tiene el mismo propósito que un experimento probar la existencia de una relación causal entre variables, aunque en el caso de esta investigación, solamente permitiría estimar los impactos del tratamiento, dependiendo de si llega a establecer una base de comparación apropiada. (Bono, 2012). El muestreo será por conveniencia debido a los costos elevados de reproducir el análisis en una muestra representativa.
- La población a utilizar no está clasificada como grupo vulnerable, ya que se intervendrá a madres lactantes, no embarazadas, ni recién nacidos. Por lo que no se incluye ningún dato pertinente a los hijos de las madres.
- Durante el proceso de tamizaje y reclutamiento se tendrá el apoyo de la Liga de la Leche, utilizando el domicilio en el que se reúnen usualmente en zona 7 para este proceso. Para el tamizaje utilizará una guía de entrevista, en la cual se incluyen todos los criterios de inclusión y exclusión.
- Se cuenta con dos fases en el estudio, por lo que para participar en cada fase se deberá firmar un consentimiento informado distinto, incluso si la misma u otra madre desea participar en la segunda fase del muestreo. En el consentimiento existe espacio para la firma de un testigo en caso la participante fuera analfabeta.
- Los criterios de exclusión e inclusión que se incluyen tamizan a la muestra para que tengan características similares, y que no influyan factores como la edad del lactante, enfermedades específicas, ingesta de medicamentos, también se excluyen madres que sean intolerantes al gluten, debido a que no se quiere

poner en riesgo a las madres, por el contenido de trigo y cebada en la bebida de cereales que será utilizada.

- La toma de muestras se realizará en el mismo domicilio de reunión usual, logrando que las madres se sientan a gusto y aun horario en ayunas que ellas prefieran, evitando mayores incomodidades para las madres.
- Los productos a utilizar en los distintos tratamientos son: Bebida de cereales Morcaff®, Azúcar Caña Real®, Azúcar importada Lantic® sin fortificar con vitamina A, Crema no láctea Poll®. Por lo que los tratamientos no presentan ningún riesgo para la población, ya que son productos que están incluidos en la dieta Guatemalteca común y los tratamientos no sobrepasan los límites de riesgo establecidos (4.500µg RE).
- Todas las muestras recolectadas serán codificadas, y se guardará confidencialidad de los datos.
- Las personas involucradas en el proceso de la investigación, serán la investigadora Gabriela Argueta, asesora Dra. Orozco y Dr. Solomons.
- Toda la información será almacenada y custodiada por la Dra. Orozco de CeSSIAM.

Apéndice 2: Cronograma

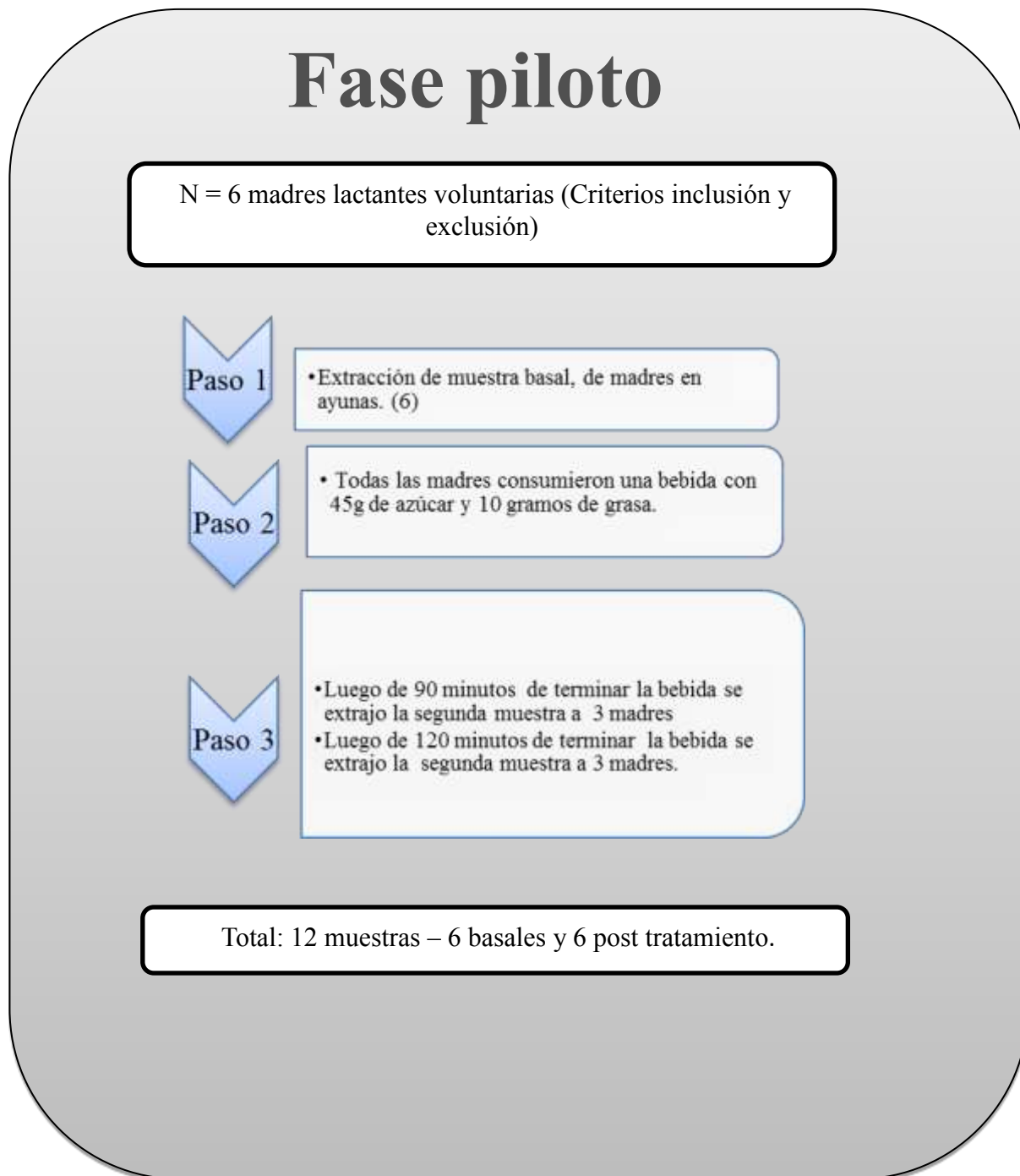
La investigación se llevó a cabo en distintas fases: la primera fue la entrega y aprobación del protocolo de trabajo. Luego se llevó a cabo el reclutamiento de los participantes con el propósito de iniciar la fase de recolección de los datos. Para la recolección de datos, se propuso utilizar 3 días no consecutivos de una semana, algunas madres, prefirieron, hacerlo tres días no consecutivos pero incluyendo fin de semana, el tiempo de recolección se alargó un poco más de lo previsto, por algunos inconvenientes para poder re contactar a las madres. Posterior a la recolección de datos, se utilizó un mes para el análisis de los datos, y finalmente un mes para entregas y correcciones.

Cuadro 15. Cronograma de trabajo enero 2013 a septiembre 2013

| Actividad | Enero | Febrero | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre | Octubre | Noviembre |
|-------------------------------|-------|---------|-------|-------|------|-------|-------|--------|------------|---------|-----------|
| Protocolo | | | | | | | | | | | |
| Reclutamiento | | | | | | | | | | | |
| Recolección de datos | | | | | | | | | | | |
| Análisis de Datos | | | | | | | | | | | |
| Entrega de Informe Final | | | | | | | | | | | |
| Presentación final de informe | | | | | | | | | | | |

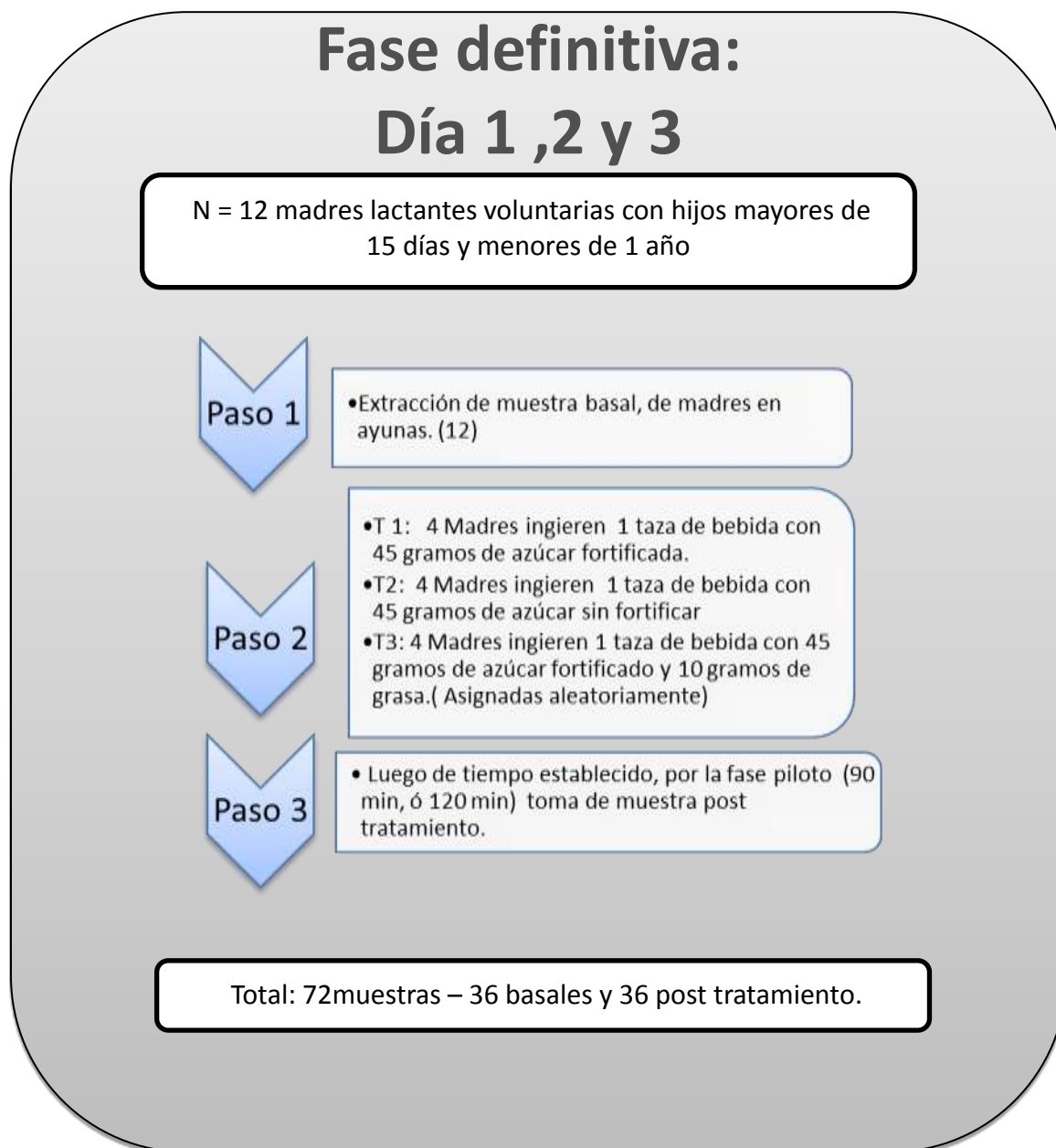
Apéndice 3: Diagrama metodología fase piloto

Figura 15. Diagrama de metodología fase piloto



Apéndice 4: Esquema de metodología de muestreo fase definitiva día 1,2 y 3

Figura 16.. Diagrama de metodología fase definitiva .



Apéndice 5: Consentimiento Informado fase piloto

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD, IMPEDIMENTOS Y
ALTERACIONES METABÓLICAS-CeSSIAM
17 AVENIDA 16-89 ZONA 11 TEL. 24733942**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
18 AVENIDA 11-95 ZONA 15. VISTA HERMOSA III.
PBX: 23640336 al 40**

CONSENTIMIENTO INFORMADO FASE PILOTO

**Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración de vitamina A en
leche materna utilizando el espectrofluorómetro iCheck™ Fluoro**

INTRODUCCIÓN:

El CeSSIAM, un centro de investigación que aborda temas relacionados con la salud y nutrición, junto con una estudiante de la Universidad de Valle de Guatemala, estamos interesados en realizar un estudio relacionado con la lactancia materna. El objetivo principal del estudio es saber si al tomar una bebida con grasa y azúcar fortificada con vitamina A, la cantidad de esta vitamina aumenta en la leche materna. También queremos saber en cuánto tiempo la cantidad de vitamina A en la leche materna sube más. Para analizar la vitamina A en la leche, se usará un instrumento llamado iCheck™ Fluoro

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR:

El estudio durará únicamente 3 horas. Se le va a pedir que venga en ayunas al lugar del estudio y que nos dé una muestra de aproximadamente 15 ml de su leche, la cual será tomada con un tiraleche limpio. Luego se le dará una bebida de cereales Morcaff®. Con azúcar y crema no láctea Poll® y se le pedirá que nos dé otra muestra de leche ya sea a la hora y media o dos horas de haber tomado la bebida. Usted podrá retirarse después de haber dado su segunda muestra de leche, la cual será analizada con el aparato iCheck™ Fluoro

RIESGOS:

No existe ningún riesgo al participar en este estudio, solo la incomodidad de la extracción de la leche y le aseguramos que todo el material utilizado es libre de contaminación.

EXCLUSIONES:

Usted no podrá participar en el estudio si está embarazada, si está tomando algún medicamento, si su hijo al cual le da lactancia materna tiene menos de 15 días o más de un año, si padece alguna enfermedad crónica o infecciosa como diabetes, hipertensión, o hipertensión, VIH/SIDA, sífilis, tuberculosis, e intolerancia al gluten.

REMUNERACIÓN:

Por su participación en el estudio, no se recibirá ningún pago, ni compensación económica. Únicamente se proveerá de un pequeño regalo que consistirá en alimentos, posterior a la toma de las muestras, por las molestias de presentarse al estudio sin comer durante 10 horas previas y darnos sus muestras de leche.

CONFIDENCIALIDAD:

Toda la información que será obtenida será codificada en números y letras, su nombre solo será conocido por los investigadores en contacto con usted. Los resultados serán publicados, pero nunca aparecerá su nombre. Porque será anónima y confidencial su participación. Únicamente la UVG y CeSSIAM aparte de la investigadora principal podrá tener acceso a la información de esta investigación.

CONTACTOS:

Si usted tiene alguna pregunta puede contactarse con la Dra. Mónica Orozco: 56307378 ó con Gabriela Argueta: 40150168. También puede contactar al Dr. Fernando Beltranena director del Comité de Derechos humanos de CeSSIAM al teléfono 23310928. Para dudas relacionadas con sus derechos como participante, puede contactar al Dr. Rolando López presidente del comité de ética de la Universidad del Valle de Guatemala al teléfono 23640336 al 40 ext. 346.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

La participación es voluntaria, y se podrá retirar del estudio en cualquier momento que desee. Solo será necesario firmar este documento que indica que conoce de qué se trata el estudio, y que contamos con su autorización por escrito. Por lo que necesitamos si está dispuesta a participar que pueda llenar las siguientes casillas con sus datos.

Yo: _____ conozco el objetivo del estudio, entiendo que los datos serán confidenciales, que no recibiré ningún pago o compensación económica. Y voluntariamente quiero participar del estudio, sabiendo que puedo retirarme en cualquier momento, sin ninguna represalia.

Nombre: _____ No.Cédula o DPI: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Firma participante: _____ Fecha: _____

Firma testigo (en caso de ser analfabeta): _____

Firmaentrevistador: _____ Fecha: _____

Apéndice 6: Consentimiento Informado fase definitiva

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD, IMPEDIMENTOS Y
ALTERACIONES METABÓLICAS-CeSSIAM
17 AVENIDA 16-89 ZONA 11 TEL. 24733942**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
18 AVENIDA 11-95 ZONA 15. VISTA HERMOSA III.
PBX:23640336 al 40**

CONSENTIMIENTO INFORMADO FASE DEFINITIVA

**Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración de vitamina A en
leche materna utilizando el espectrofluorómetro iCheck™Fluoro**

INTRODUCCIÓN:

El CeSSIAM, un centro de investigación que aborda temas relacionados con la salud y nutrición, junto con una estudiante de la Universidad de Valle de Guatemala, estamos interesados en realizar un estudio relacionado con la lactancia materna. El objetivo principal del estudio es saber cuánta vitamina A tiene la leche materna, luego de haber tomado una bebida con azúcar fortificada con esta vitamina. Para analizar la vitamina A en la leche, se usará un instrumento llamado iCheck™Fluoro. También se quieren estudiar los cambios en la cantidad de vitamina A en la leche materna después de haber tomado esta bebida con azúcar fortificada y grasa.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR:

El estudio durará únicamente tres días no seguidos. Se le va a pedir que venga en ayunas al lugar del estudio y que nos dé dos muestras de aproximadamente 15 ml de su leche, la cual será tomada con un tiraleche limpio. En cada uno de los días del estudio, debemos tomar muestras de su leche dos veces, la primera vez antes de que tome una de tres formas de bebida con azúcar y la segunda xx (a ser determinado, 90 ó 120 minutos) horas después de haberla tomado. Este procedimiento será en tres días no consecutivos. Usted por sorteo será asignada a uno de estos tres grupos y deberá tomar aproximadamente una taza de una de estas tres bebidas:

1. 250 ml de bebida de cereales Morcaff® con 3 cucharadas de azúcar sin vitamina A
2. 250 ml de bebida de cereales Morcaff® con 3 cucharadas de azúcar fortificada con vitamina A
3. 250 ml de bebida de cereales Morcaff® con 3 cucharadas de azúcar fortificada con vitamina A y 2 cucharadas de crema no láctea Poll®

Usted podrá retirarse después de haber dado su segunda muestra de leche. Sus muestras de leche serán analizadas con el aparato iCheck™ Fluoro

RIESGOS:

No existe ningún riesgo al participar en este estudio, solo la incomodidad de la extracción de la leche y le aseguramos que todo el material utilizado es libre de contaminación.

EXCLUSIONES:

Usted no podrá participar en el estudio si está embarazada, si está tomando algún medicamento, si su hijo al cual le da lactancia materna tiene menos de 15 días o más de 1 año, si padece alguna enfermedad crónica o infecciosa como diabetes, hipertensión, o hipertensión, VIH/SIDA, sífilis, tuberculosis, e intolerancia al gluten..

REMUNERACIÓN:

Por su participación en el estudio, no se recibirá ningún pago, ni compensación económica. Únicamente se proveerá de un pequeño regalo que consistirá en alimentos, posterior a la toma de las muestras, por las molestias de presentarse al estudio sin comer durante 10 horas previas y darnos sus muestras de leche.

CONFIDENCIALIDAD:

Toda la información que será obtenida será codificada en números y letras, su nombre solo será conocido por los investigadores en contacto con usted. Los resultados serán publicados, pero nunca aparecerá su nombre. Porque será anónima y confidencial su participación.

CONTACTOS:

Si usted tiene alguna pregunta puede contactarse con la Dra. Mónica Orozco: 56307378 ó con Gabriela Argueta: 40150168. También puede contactar al Dr. Fernando Beltranena director del Comité de Derechos humanos de CeSSIAM al teléfono 23310928. Para dudas relacionadas con sus derechos como participante, puede contactar al Dr. Rolando López presidente del comité de ética de la Universidad del Valle de Guatemala al teléfono 23640336 al 40 ext. 346.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

La participación es voluntaria, y se podrá retirar del estudio en cualquier momento que desee. Solo será necesario firmar este documento que indica que conoce de qué se trata el estudio, y que contamos con su autorización por escrito. Por lo que necesitamos si está dispuesta a participar que pueda llenar las siguientes casillas con sus datos.

Yo: _____ conozco el objetivo del estudio, entiendo que los datos serán confidenciales, que no recibiré ningún pago o compensación económica. Y voluntariamente quiero participar del estudio, sabiendo que puedo retirarme en cualquier momento, sin ninguna represalia.

Nombre: _____ No. Cédula o DPI: _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Firma participante: _____ Fecha: _____

Firma testigo (en caso de ser analfabeta): _____

Firma entrevistador: _____ Fecha: _____

Apéndice 8: Instrumento de recolección de datos fase definitiva.

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD, IMPEDIMENTOS Y ALTERACIONES METABÓLICAS-
CeSSIAM**

**17 AVENIDA 16-89 ZONA 11 TEL. 24733942
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
18 AVENIDA 11-95 ZONA 15. VISTA HERMOSA III.
PBX:23640336 al 40**

Hoja de Recolección de Datos Fase Definitiva

Estudio: Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración de vitamina A en leche materna utilizando el espectrofluorómetro iCheck™ Fluoro

| Fecha | Código | Tratamiento | ml antes de bebida | Hora término bebida | Hora Inicio extracción (1 ½ hrs desp) | ml después de bebida |
|--------------|---------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------|
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Apéndice 9: Material utilizado para información y reclutamiento del estudio.

RELACIÓN ENTRE LA FORTIFICACIÓN DEL AZÚCAR Y LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA A EN LA LECHE MATERNA UTILIZANDO EL ESPECTROFLUORÓMETRO ICHECK FLUORO®



Introducción

- Hipovitaminosis A - Fortificación de azúcar como vehículo de vitamina A. (Dary, 1994).
- Algunos estudios han demostrado que la suplementación de la madre lactante con altas dosis de Vitamina A aumenta la concentración de esta vitamina en la leche materna.
- En países como Bangladesh, Indonesia e India se han realizado pruebas de suplementación donde se demuestra este incremento de los niveles de vitamina A en la leche. (Ross, 2003).
- Otros estudios en niños han demostrado que la suplementación de grasa mejora la absorción de b-caroteno y mejora el estatus de vitamina A, ya que se encontraron mayores concentraciones de retinol en la leche materna suplementada con grasa. (Aiam, 2010)

- En Guatemala, todavía existe la necesidad de un método con el cual se pueda determinar fácilmente, con alta precisión y exactitud el estatus individual y poblacional de una deficiencia o exceso de esta vitamina.
- En el 2011 Omar Dary propone un método nuevo para el análisis de leche utilizando el equipo iCheckFluoro.
- Este es un espectrofluorómetro portátil de baterías, que tiene aplicación en la medición de Vitamina A.
- El análisis de las muestras es rápido y está validado con el método de cromatografía líquida HPLC.
- Esto es una innovación que pretende simplificar el análisis y monitoreo de la fortificación de los alimentos, por medio del análisis de muestras de fluidos y algunos alimentos, identificando deficiencia o exceso de la Vitamina A. (Frey, 2011)

ESPECTROFLUORÓMETRO ICHECK FLUORO®



<http://www.aces.edu/aces/acespublications/2012/02/>
 Si deseas observar el uso del instrumento puedes utilizar este hipervínculo, que te mostrará un video.

¿Quiénes están realizando la investigación?

- El CESSIAM, un centro de investigación que aborda temas relacionados con la salud y nutrición, junto con una estudiante de la Universidad de Valle de Guatemala, estamos interesados en realizar un estudio relacionado con la lactancia materna y la ingesta vitamina A.

Objetivos

- Cuantificar vitamina A tiene la leche materna, luego de haber tomado una bebida con azúcar fortificada con esta vitamina.
- También se quieren estudiar los cambios en la cantidad de vitamina A en la leche materna después de haber tomado esta bebida con azúcar fortificada y grasa.
- Utilizar un instrumento llamado iCheckFluoro® para cuantificar rápida de retinol.



Fase piloto

- Luego de firmar el consentimiento informado, la fase durará únicamente 3 horas.
- Se le va a pedir que venga en ayunas al lugar del estudio y que nos dé una muestra de aproximadamente 15 ml de su leche, la cual será tomada con un frasco limpio.
- Luego se le dará una bebida de cereales con azúcar y crema láctea Pol®.
- Se le pedirá que nos dé otra muestra de leche ya sea a la hora, hora y media o dos horas de haber tomado la bebida.
- Usted podrá retirarse después de haber dado su segunda muestra de leche, la cual será analizada con el aparato iCheckFluor®.

Metodología: Fases



Fase Piloto

• 11 madres lactantes voluntarias con hijos menores de 1 año y menores de 1 año.

- Paso 1:** Recibir la bebida con azúcar y crema láctea Pol®.
- Paso 2:** Dar la muestra de leche (antes de la bebida y después de la bebida).
- Paso 3:** Dar la muestra de leche (antes de la bebida y después de la bebida).

Total: 33 minutos - 11 horas y 11 por teléfono.

Fase Definitiva

- El estudio durará únicamente 3 días no seguidos, luego de firmar el consentimiento informado.
- Se le va a pedir que venga en ayunas al lugar del estudio y que nos dé dos muestras de aproximadamente 15 ml de su leche, la cual será tomada con un frasco limpio.
- En cada uno de los días del estudio, debemos tomar muestras de su leche dos veces, la primera vez antes de que tome una de tres formas de bebida con azúcar y la segunda xx (a ser determinada, 60 a 120 minutos) horas después de haberla tomado.

Usted por sorteo será asignada a uno de estos tres grupos y deberá tomar aproximadamente una taza de una de estas tres bebidas:

- 250 ml de bebida de cereales con 3 cucharadas de azúcar sin vitamina A.
- 250 ml de bebida de cereales con 3 cucharadas de azúcar fortificada con vitamina A.
- 250 ml de bebida de cereales con 3 cucharadas de azúcar fortificada con vitamina A y 2 cucharadas de crema láctea Pol®.



Día 1

• 11 madres lactantes voluntarias con hijos menores de 1 año y menores de 1 año.

- Paso 1:** Recibir la bebida con azúcar y crema láctea Pol®.
- Paso 2:** Dar la muestra de leche (antes de la bebida y después de la bebida).
- Paso 3:** Dar la muestra de leche (antes de la bebida y después de la bebida).

Total: 33 minutos - 11 horas y 11 por teléfono.



Remuneración:

Por su participación en el estudio, no se recibirá ningún pago, ni compensación económica. Únicamente se proveerá de un pequeño regalo que consistirá en alimentos, posterior a la toma de las muestras, por las molestias de presentarse al estudio sin comer durante 10 horas previas y donar sus muestras de leche.



Inclusiones y Exclusiones

SI

Si es mayor de 18 años.
Si se da lactancia a su hijo de 15 a 1 año de edad.

No

Si está embarazada.
Si está tomando algún medicamento.
Si su hijo al nacer le da lactancia materna tiene menos de 10 días o más de 1 año.
Si existe alguna enfermedad crónica o infección como diabetes, hipertensión, o hipercolesterolemia.
Si es intolerante a la lactosa.

Participación voluntaria

La participación es voluntaria, y se podrá retirar del estudio en cualquier momento que desee.

Si desea ser parte del estudio, por favor anotarse en el listado para reunirse con la investigadora principal y ampliar la información.



Confidencialidad:

- Toda la información que será obtenida será codificada en números y letras, su nombre solo será conocida por los investigadores en contacto con usted. Los resultados serán publicados, pero nunca aparecerá su nombre. Porque será anónima y confidencial su participación.



Riesgos:

- No existe ningún riesgo al participar en este estudio, solo la incomodidad de la extracción de la leche y le aseguramos que todo el material utilizado es libre de contaminación.



Estas interesada en participar? Quieres contribuir a población Guatemalteca con tu participación?



Por favor Contactar a
 Gabriela Argueta: 40150168
 gabrielaargueta.c@gmail.com

Apéndice 10: Guía de entrevista en la fase de tamizaje.

**CENTRO DE ESTUDIOS EN SENSORIOPATIAS, SENECTUD, IMPEDIMENTOS Y
ALTERACIONES METABÓLICAS-CeSSIAM
17 AVENIDA 16-89 ZONA 11 TEL. 24733942
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
18 AVENIDA 11-95 ZONA 15. VISTA HERMOSA III.
PBX:23640336 al 40**

GUÍA DE ENTREVISTA

**Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración de vitamina A en
leche materna utilizando el espectrofluorómetro iCheck™Fluoro**

Nombre:_____ Edad:_____ Peso:_____ Talla:_____

Edad lactante:_____

¿Está dispuesta voluntariamente a participar en el estudio? Sí o No

¿Está dispuesta voluntariamente a participar en el estudio? Sí o No

¿Está usted segura que no está embarazada en este momento? Sí o No

¿Padece usted de alguna enfermedad crónica como: DM, HTA,
HIPERCOLESTEROLEMIA? Sí o No

¿Padece usted alguna enfermedad infecciosa ETS, o TB? Sí o No

¿Padece usted de algún problema en sus senos, como lesiones o
mastitis? Sí o No

¿Es usted intolerante al gluten? Sí o No

¿Está tomando algún medicamento? Sí o No

Apéndice 11. Pruebas estadísticas t de Student

Cuadro 16. Pruebas t para cambio de retinol en el tiempo basal e inicial de cada tratamiento,

| Tratamiento A1- Azúcar fortificada | | |
|--|--------------|--------------|
| <i>n=12</i> | <i>Basal</i> | <i>Final</i> |
| Media | 508.8333 | 605.5833 |
| Varianza | 40094.33 | 41371.54 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0.113963 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | -1.24745 | |
| P(T<=t) una cola | 0.119068 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795885 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.238136 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.200985 | |
| Tratamiento A2- Azúcar sin fortificar | | |
| <i>n=12</i> | <i>Basal</i> | <i>Final</i> |
| Media | 682.25 | 711 |
| Varianza | 203160.9 | 47964.36 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0.32694 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | -0.23057 | |
| P(T<=t) una cola | 0.410941 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795885 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.821883 | |

(Continuación cuadro 16)

| Tratamiento G- Azúcar fortificada más grasa | | |
|--|--------------|--------------|
| <i>n=12</i> | <i>Basal</i> | <i>Final</i> |
| Media | 619.5 | 713.5 |
| Varianza | 52210.82 | 60413.73 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0.272774 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | -1.13724 | |
| P(T<=t) una cola | 0.139803 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795885 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.279605 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.200985 | |

Cuadro 17. Pruebas t para cambio de retinol normalizado en el tiempo basal e inicial de cada tratamiento.

| Tratamiento A1- Azúcar fortificada | | |
|---|--------------|--------------|
| <i>n=12</i> | <i>Basal</i> | <i>Final</i> |
| Media | 13 | 13 |
| Varianza | 20.51515152 | 18.26515 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0.515813228 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | - | |
| | 0.465914281 | |
| P(T<=t) una cola | 0.325183278 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795884814 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.650366556 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.200985159 | |

(Continuación cuadro 17)

| Tratamiento A2-Azúcar sin fortificar | | |
|---|--------------|--------------|
| <i>n=12</i> | <i>Basal</i> | <i>final</i> |
| Media | 17 | 15 |
| Varianza | 34.81060606 | 30.93182 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0.632353002 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | 1.641645516 | |
| P(T<=t) una cola | 0.064458033 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795884814 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.128916067 | |
| Tratamiento G- Azúcar fortificada más grasa. | | |
| <i>n=12</i> | <i>Basal</i> | <i>Final</i> |
| Media | 13 | 14 |
| Varianza | 21.53787879 | 25.90152 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0.84324273 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | -0.2093435 | |
| P(T<=t) una cola | 0.41900331 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795884814 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.83800662 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.200985159 | |

Cuadro 18. Pruebas t para cambio de grasa en el tiempo basal e inicial de cada tratamiento.

| Tratamiento A1- Azúcar fortificada | | |
|--|--------------|--------------|
| <i>n=12</i> | <i>basal</i> | <i>final</i> |
| Media | 36.66666667 | 43.66667 |
| Varianza | 267.1515152 | 728.9697 |
| Observaciones | 12 | 12 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0.555315691 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | -1.077986705 | |
| P(T<=t) una cola | 0.152055839 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795884814 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.304111678 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.200985159 | |
| Tratamiento A2- Azúcar sin fortificar | | |
| <i>n=12</i> | <i>basal</i> | <i>final</i> |
| Media | 38.91666667 | 48 |
| Varianza | 627.1742424 | 448 |
| Observaciones | 12 | 12 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0.756675556 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | -1.904410544 | |
| P(T<=t) una cola | 0.041662965 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795884814 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.08332593 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.200985159 | |

(Continuación cuadro 18)

| Tratamiento G- Azúcar fortificada más grasa | | |
|--|--------------|--------------|
| <i>n=12</i> | <i>Basal</i> | <i>Final</i> |
| Media | 45 | 52.41667 |
| Varianza | 412.9090909 | 501.5379 |
| Observaciones | 12 | 12 |
| Coeficiente de correlación de Pearson | 0.869594712 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 11 | |
| Estadístico t | -2.316648812 | |
| P(T<=t) una cola | 0.020409017 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.795884814 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.040818034 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.200985159 | |

Apéndice 12. Pruebas estadísticas de ANOVA con medidas repetidas.

Cuadro 19. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol inicial

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadístico | Gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Crude retinol (mg Re/L) (baseline) | .147 | 36 | .047 | .854 | 36 | .000 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

A.

Cuadro 20. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol final

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadístico | Gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Cruderetinol (mg Re/L) (final) | .082 | 36 | .200* | .975 | 36 | .565 |

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro 21. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos cambio retinol

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadístico | Gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Crude retinol (mg Re/L) (change) | .112 | 36 | .200* | .926 | 36 | .019 |

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro 22. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol normalizado inicial

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|--|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Normalized retinol (ug/g of fat) (baseline) | .104 | 36 | .200* | .959 | 36 | .200 |

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro 23. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos retinol normalizado final

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|--|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Normalized retinol (ug/g of fat) (final) | .104 | 36 | .200* | .944 | 36 | .068 |

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro 24. Pruebas estadísticas de normalidad para los datos del cambio retinol normalizado

| Pruebas de normalidad | | | | | | |
|---|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Normalized retinol (ug/g of fat) (change) | .175 | 36 | .007 | .848 | 36 | .000 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro 25. Pruebas de esfericidad para retinol

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: Retinol INICIAL

| Efecto inter sujetos | W de Mauchly | Aprox. Chi-cuadrado | Gl | Sig. | Épsilon ^b | | |
|----------------------|--------------|---------------------|----|------|----------------------|-------------|-----------------|
| | | | | | Greenhouse-Geisser | Huynh-Feldt | Límite inferior |
| Treatments | .810 | 2.105 | 2 | .349 | .840 | .975 | .500 |

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación

Diseño dentro de sujetos: Treatments

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: Cruderetinoifinal

| Efecto inter sujetos | W de Mauchly | Aprox. Chi-cuadrado | Gl | Sig. | Épsilon ^b | | |
|----------------------|--------------|---------------------|----|------|----------------------|-------------|-----------------|
| | | | | | Greenhouse-Geisser | Huynh-Feldt | Límite inferior |
| Treatments | .824 | 1.931 | 2 | .381 | .851 | .990 | .500 |

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación

Diseño dentro de sujetos: Treatments

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: CrudeRetinol

| Efecto inter sujetos | W de Mauchly | Aprox. Chi-cuadrado | gl | Sig. | Épsilon ^b | | |
|----------------------|--------------|---------------------|----|------|----------------------|-------------|-----------------|
| | | | | | Greenhouse-Geisser | Huynh-Feldt | Límite inferior |
| Treatmeants | .811 | 2.096 | 2 | .351 | .841 | .976 | .500 |

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación

Diseño dentro de sujetos: Treatmeants

- c. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Cuadro 26 Pruebas de esfericidad para retinol normalizado

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: RETINOL NORMALIZADO INICIAL

| Efecto inter sujetos | W de Mauchly | Aprox. Chi-cuadrado | gl | Sig. | Épsilon ^b | | |
|----------------------|--------------|---------------------|----|------|----------------------|-------------|-----------------|
| | | | | | Greenhouse-Geisser | Huynh-Feldt | Límite inferior |
| Treatments | .699 | 3.578 | 2 | .167 | .769 | .869 | .500 |

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación

Diseño dentro de sujetos: Treatments

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: RETINOL NORMALIZADO FINAL

| Efecto inter sujetos | W de Mauchly | Aprox. Chi-cuadrado | gl | Sig. | Épsilon ^b | | |
|----------------------|--------------|---------------------|----|------|----------------------|-------------|-----------------|
| | | | | | Greenhouse-Geisser | Huynh-Feldt | Límite inferior |
| Treatments | .801 | 2.214 | 2 | .330 | .834 | .966 | .500 |

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación

Diseño dentro de sujetos: Treatments

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: RETINOL NORMALIZADO CAMBIO

| Efecto inter sujetos | W de Mauchly | Aprox. Chi-cuadrado | gl | Sig. | Épsilon ^b | | |
|----------------------|--------------|---------------------|----|------|----------------------|-------------|-----------------|
| | | | | | Greenhouse-Geisser | Huynh-Feldt | Límite inferior |
| Treatments | .811 | 2.096 | 2 | .351 | .841 | .976 | .500 |

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación

Diseño dentro de sujetos: Treatments

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Cuadro 27. Pruebas de medidas repetidas para los datos de retinol

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: RETINOL INICIAL

| Origen | | Tipo III de suma de cuadrados | gl | Cuadrático promedio | F | Sig. | Eta parcial al cuadrado |
|------------|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------|-------|------|-------------------------|
| Treatments | Esfericidad asumida | 185032.056 | 2 | 92516.028 | 1.226 | .313 | .100 |
| | Greenhouse-Geisser | 185032.056 | 1.681 | 110075.616 | 1.226 | .309 | .100 |
| | Huynh-Feldt | 185032.056 | 1.950 | 94891.840 | 1.226 | .312 | .100 |
| | Límite inferior | 185032.056 | 1.000 | 185032.056 | 1.226 | .292 | .100 |

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: RETINOL FINAL

| Origen | | Tipo III de suma de cuadrados | gl | Cuadrático promedio | F | Sig. | Eta parcial al cuadrado |
|------------|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------|-------|------|-------------------------|
| Treatments | Esfericidad asumida | 91059.722 | 2 | 45529.861 | 1.568 | .231 | .125 |
| | Greenhouse-Geisser | 91059.722 | 1.701 | 53523.205 | 1.568 | .234 | .125 |
| | Huynh-Feldt | 91059.722 | 1.980 | 45978.883 | 1.568 | .231 | .125 |
| | Límite inferior | 91059.722 | 1.000 | 91059.722 | 1.568 | .236 | .125 |

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: CAMBIO DE RETINOL

| Origen | | Tipo III de suma de cuadrados | gl | Cuadrático promedio | F | Sig. | Eta parcial al cuadrado |
|-------------|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------|------|------|-------------------------|
| Treatmeants | Esfericidad asumida | 35556.500 | 2 | 17778.250 | .132 | .877 | .012 |
| | Greenhouse-Geisser | 35556.500 | 1.682 | 21140.384 | .132 | .843 | .012 |
| | Huynh-Feldt | 35556.500 | 1.951 | 18221.239 | .132 | .872 | .012 |
| | Límite inferior | 35556.500 | 1.000 | 35556.500 | .132 | .723 | .012 |

Cuadro 28 Pruebas de medidas repetidas para los datos de retinol normalizado

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: RETINOL NORMALIZADO INICIAL

| Origen | | Tipo III de suma de cuadrados | Gl | Cuadrático promedio | F | Sig. | Eta parcial al cuadrado |
|------------|---------------------|-------------------------------|--------|---------------------|-------|------|-------------------------|
| Treatments | Esfericidad asumida | 121.132 | 2 | 60.566 | 4.367 | .025 | .284 |
| | Greenhouse-Geisser | 121.132 | 1.538 | 78.785 | 4.367 | .038 | .284 |
| | Huynh-Feldt | 121.132 | 1.738 | 69.678 | 4.367 | .032 | .284 |
| | Límite inferior | 121.132 | 1.000 | 121.132 | 4.367 | .061 | .284 |
| | Límite inferior | 305.110 | 11.000 | 27.737 | | | |

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: RETINOL NORMALIZADO FINAL

| Origen | | Tipo III de suma de cuadrados | Gl | Cuadrático promedio | F | Sig. | Eta parcial al cuadrado |
|------------|---------------------|-------------------------------|-------|---------------------|------|------|-------------------------|
| Treatments | Esfericidad asumida | 13.987 | 2 | 6.994 | .714 | .501 | .061 |
| | Greenhouse-Geisser | 13.987 | 1.669 | 8.383 | .714 | .478 | .061 |
| | Huynh-Feldt | 13.987 | 1.931 | 7.242 | .714 | .496 | .061 |
| | Límite inferior | 13.987 | 1.000 | 13.987 | .714 | .416 | .061 |
| | Límite inferior | 13.987 | 1.000 | 13.987 | .714 | .416 | .061 |

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: RETINOL NORMALIZADO CAMBIO

| Origen | | Tipo III de suma de cuadrados | gl | Cuadrático promedio | F | Sig. | Eta parcial al cuadrado |
|------------|---------------------|----------------------------------|-------|------------------------|-------|------|----------------------------|
| Treatments | Esfericidad asumida | 52.819 | 2 | 26.410 | 1.337 | .283 | .108 |
| | Greenhouse-Geisser | 52.819 | 1.961 | 26.928 | 1.337 | .283 | .108 |
| | Huynh-Feldt | 52.819 | 2.000 | 26.410 | 1.337 | .283 | .108 |
| | Límite inferior | 52.819 | 1.000 | 52.819 | 1.337 | .272 | .108 |

Apéndice 14. Cartas de Aprobación de protocolo



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

11 Calle 16 78, Zona 13 V.H.
Aparato Postal No. 82, 01301
Guatemala, Guatemala, G.A.

POX 2368 0213 G.G.
Tel. 2368 0236 G.G.
2368 0488 G.G.
FAX (502) 2367 0212
www.uvg.edu.gt

Guatemala 20 de mayo de 2013.

| | |
|---------------|-----------------|
| No. protocolo | NU1 001 05 2013 |
|---------------|-----------------|

A: **Doctora**
Mónica Orozco Figueroa
Investigador Principal
Stephanie Gabriela Argueta Contreras, 08451
Coinvestigador
Departamento de Nutrición

DE: Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala (UVG)

ASUNTO: Protocolo "Relación entre la fortificación del azúcar y la concentración de vitamina A en la leche materna utilizando el espectrofluorómetro iCheckFluoro®".

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la UVG ha revisado y aprobado el protocolo arriba indicado. Se le recuerda que el comité debe revisar y aprobar todos protocolos de investigación que utilicen la experimentación biomédica en seres humanos, en intervalos apropiados y de acuerdo al nivel de riesgo, por lo menos una vez al año. Si el proyecto dura más de un año, es responsabilidad del investigador, enviar al comité el protocolo de investigación para revisión y solicitud de aprobación de continuación del estudio.

Archive esta notificación como prueba de la aprobación. Para evitar atrasos en la aprobación de su investigación y la posible suspensión del estudio, por favor envíe su solicitud de continuación, por lo menos seis semanas antes de cumplirse seis meses después de haber sido autorizado por este comité.

Cualquier problema o evento serio relacionado con el estudio, deberá ser notificado inmediatamente al Comité. Cualquier modificación al protocolo debe ser enviada al Comité para su aprobación antes de ser implementada.

Si tiene alguna duda o pregunta, por favor contactar a la Lda. Lucía Nitsch Velásquez, Secretaria del Comité de Ética, al teléfono 2368 8399, extensión 301 y/o 385 o al correo electrónico lnitsch@uvg.edu.gt


Dr. Enrique Rolando López
Presidencia Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala