



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**Facultad de Ciencias e Ingeniería**

**“Alberto Cazorla Talleri”**

Evaluación tóxica aguda y efecto sobre los niveles de hemoglobina en ratas inducidas a anemia ferropénica de tres fórmulas alimenticias conteniendo quinua extruida, harina de arroz, suero de leche y hierro hemínico

Tesis para optar el Título de Licenciado en Nutrición

**AUTORA**

Georgina Lourdes Caceres Palma

**Lima – Perú**

**2023**

**Asesor de tesis**

MSc. Leon Faustino Villegas Vilchez

**Co asesor de la Tesis**

Lic. Andres Moises Anampa Monzon

## **Dedicatoria**

Por sobre todas las cosas a mis queridos padres porque gracias a ellos soy la persona que soy actualmente; todos mis logros se los debo a ustedes. Gracias por inculcarme los valores más importantes en esta vida y a ser perseverante en mis objetivos. Así mismo, a mi amigo junior por el apoyo en todo este proceso, alentarme y estar conmigo siempre.

## **Agradecimientos**

- A mis padres y mis hermanos por el apoyo constante en todo este tiempo y no dejar que me rinda en el camino.
- A mis asesores, por brindarme su tiempo en evaluar y aconsejarme con el objetivo de culminar el presente trabajo.
- Al señor Julio Hidalgo, por ayudarme en la parte experimental de mi trabajo, su tiempo y paciencia hacia mi persona.

Evaluación tóxica aguda y efecto sobre los niveles de hemoglobina en ratas inducidas a anemia ferropénica de tres fórmulas alimenticias conteniendo quinua extruida, harina de arroz, suero de leche y h

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://scielo.isciii.es">scielo.isciii.es</a> Fuente de Internet	2%
2	<a href="https://cybertesis.unmsm.edu.pe">cybertesis.unmsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="https://repositorio.unsa.edu.pe">repositorio.unsa.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="https://repositorio.upch.edu.pe">repositorio.upch.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://www.sabiia.cnptia.embrapa.br">www.sabiia.cnptia.embrapa.br</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="https://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to unap Trabajo del estudiante	<1%
8	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	<1%

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
IV. JUSTIFICACIÓN.....	12
V. OBJETIVOS .....	14
VI. METODOLOGÍA.....	14
VII. RESULTADOS.....	25
VIII. DISCUSIÓN.....	32
IX. CONCLUSIONES.....	36
X. LIMITACIONES.....	37
XI. FORTALEZAS.....	37
XII. RECOMENDACIONES.....	38
XIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	38
XIV. ANEXOS .....	46

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de variables dependientes.....	16
<b>Tabla 2.</b> Dieta experimental libre de hierro.....	21
<b>Tabla 3.</b> Valores de referencia del nivel de hemoglobina en ratas según rango de edad.....	49
<b>Tabla 4.</b> Requerimiento nutricional diario en ratas.....	49
<b>Tabla 5.</b> Toxicidad aguda: Registro de mortalidad en las ratas .....	25
<b>Tabla 6.</b> Toxicidad aguda: Peso corporal de ratas (g) según tratamiento (primer ensayo).....	26
<b>Tabla 6.1.</b> Toxicidad aguda: Peso corporal de ratas (g) según tratamiento (segundo ensayo) .....	26
<b>Tabla 7.</b> Toxicidad aguda: Ficha de registro de signos clínicos de toxicidad.....	50
<b>Tabla 8.</b> Actividad antianémico: Peso corporal (g) de ratas según tratamiento.....	29
<b>Tabla 9.</b> Actividad antianémico: Nivel de hemoglobina (g/dL) de ratas según tratamiento.....	31

## LISTA DE FIGURAS

### Página

<b>Figura 1.</b> Flujograma de procedimiento de prueba con una dosis inicial de 2000 mg /kg de peso corporal.....	20
<b>Figura 2.</b> Actividad antianémica: Nivel de hemoglobina (g/dL) de ratas según tratamiento durante las 4 semanas de experimentación.....	28
<b>Figura 3.</b> Actividad antianémica: Peso corporal (g) de ratas según tratamiento durante las 4 semanas de tratamiento .....	28
<b>Figura 4.</b> Dosaje de hemoglobina: Extracción de sangre del seno retro - orbital en ratas.....	46
<b>Figura 5.</b> Pesado de los animales de experimentación (ratas cepa Holtzman) en balanza analítica.....	47
<b>Figura 6.</b> Periodo de adaptación de las ratas de experimentación.....	47
<b>Figura 7.</b> Niñas y niños de 6 a 35 meses de edad con anemia, 2009-2022.....	51



## ABREVIACIONES

<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>FA</b>	Fórmula alimenticia
<b>mg FA/kg</b>	Miligramo de fórmula alimenticia por kilogramo de peso corporal
<b>mg/kg</b>	Miligramo por kilogramo de peso corporal
<b>mg Fe/kg</b>	Miligramo de hierro por kilogramo de peso corporal
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>MINSA</b>	Ministerio de Salud
<b>SF</b>	Sulfato ferroso
<b>g/dL</b>	Gramos por decilitro
<b>g</b>	Gramos
<b>Fe</b>	Hierro
<b>Kcal</b>	Kilocaloría
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mg/kg/día</b>	Miligramo por kilogramo de peso corporal por día
<b>ml</b>	Mililitro
<b>HM</b>	Hierro hemínico
<b>ONG</b>	Organización no gubernamental
<b>MIDIS</b>	Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social



## RESUMEN

La anemia es uno de los principales problemas de salud pública a nivel nacional; por ello se desea evaluar nuevas fórmulas alimenticias que ayuden a disminuir su incidencia.

**Objetivo:** Evaluar la toxicidad aguda de tres fórmulas alimenticias (FA1, FA2, FA3) y el efecto de estas sobre los niveles de hemoglobina en ratas con anemia ferropénica inducida.

**Metodología:** Se utilizaron en total 78 ratas cepa Holtzman, 24 para toxicidad aguda y 54 para la actividad antianémica. Se utilizó como referencia la guía n°423 de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) para el ensayo de toxicidad aguda oral en ratas. En el ensayo 1, se formaron 4 grupos (3 animales/grupo):

**1)** Grupo control (agua destilada), **2)** Grupo FA1, **3)** Grupo FA2 y **4)** Grupo FA3, con dosis inicial de 2000 mg/kg en cada grupo. El ensayo 2 se dio bajo las mismas condiciones que el ensayo 1, pero con diferentes animales.

Al evaluar la actividad antianémica, se realizó la inducción de anemia ferropénica mediante la administración de una dieta libre de hierro durante 30 días. Se formaron 9 grupos (6 animales/grupo) y se aplicaron los tratamientos durante 28 días: **1)** Grupo control sin anemia, **2)** Grupo control anémico, **3)** Grupo SF = 1 mg/día de sulfato ferroso (SF), **4)** Grupo HM (hierro hemínico) = 125 mg de HM/kg de peso corporal de rata, **5)** Grupo FA1-500 = 500 mg de FA1/kg, **6)** Grupo FA1-1000 = 1000 mg de FA1/kg, **7)** Grupo FA1-2000 = 2000 mg de FA1/kg, **8)** Grupo FA2-2000 = 2000 mg de FA2/kg y **9)** Grupo FA3-2000 = 2000 mg de FA3/kg.

**Resultados:** Durante el ensayo 1 y 2, no se evidenció mortalidad ni síntomas de toxicidad en ninguno de los animales en la dosis de 2000 mg/kg. Así mismo, las 3 fórmulas alimenticias lograron revertir la anemia en la última semana, sustentado por la recuperación de los niveles de Hb a valores fisiológicamente normales; sin embargo, el grupo FA1-2000 obtuvo la mejor respuesta antianémica. **Conclusión:** Las tres fórmulas alimenticias (FA1, FA2, FA3) son inocuas en la dosis de 2000 mg/kg, y tras 28 días de tratamiento, presentaron un efecto antianémico en los animales de experimentación.

**Palabras claves:** Hemoglobina, anemia ferropénica, ratas anémicas, quinua, sulfato ferroso, hierro hemínico.

## ABSTRACT

Anemia is one of the main public health problems at the national level; For this reason, it is desired to evaluate new food formulas that help to reduce its incidence. **Objective:** To evaluate the acute toxicity of three food formulas (FA1, FA2, FA3) and their effect on hemoglobin levels in rats with induced iron deficiency anemia. **Methodology:** A total of 78 Holtzman strain rats were used, 24 for acute toxicity and 54 for antianemic activity. The guide n°423 of the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) was used as a reference for the acute oral toxicity test in rats. In trial 1, 4 groups were formed (3 animals/group): **1)** Control group (distilled water), **2)** Group FA1, **3)** Group FA2 and Group FA3, with an initial dose of 2000 mg/kg in each group. In the second part of the study, the induction of anemia was carried out using an iron-free diet. 9 groups (6 animals/group) were formed: **1)** Control without anemia, **2)** Anemic control, **3)** SF group = 1 mg/day of SF (ferrous sulfate), **4)** HM (heme iron) group = 125 mg of HM/kg rat body weight, **5)** FA1-500 group = 500 mg of FA1/kg, **6)** FA1-1000 group = 1000 mg of FA1/kg, **7)** FA1-2000 group = 2000 mg of FA1/kg, **8)** FA2-2000 group = 2000 mg of FA2/kg and **9)** FA3-2000 group = 2000 mg of FA3/kg. **Results:** During trials 1 and 2, there was no evidence of mortality or toxicity symptoms in any of the animals at the 2000 mg/kg dose. Likewise, the 3 food formulas managed to reverse the anemia in the last week, supported by the recovery of Hb levels to physiologically normal values; however, the FA1-2000 group obtained the best anti-anemic response. **Conclusion:** the three food formulae are not toxic with the dose tested and in 4 weeks of treatment, all groups showed anti-anemic activity in rats.

**Keywords:** Hemoglobin, iron deficiency anemia, quinoa, ferrous sulfate, and anemic rats.

## I. INTRODUCCIÓN

Las conexiones cerebrales durante el desarrollo infantil temprano, se dan a una determinada velocidad que solo ocurre en esa etapa de vida, jugando un rol importante para el desarrollo cognitivo y social, así como para la capacidad de aprendizaje, solución de problemas y el cómo relacionarse con los demás. Por lo tanto, al ser una etapa crítica, debe desarrollarse bajo una adecuada nutrición y no presentar carencias nutricionales, ya que se podrían presentar efectos irreversibles (1).

Una de las principales carencias nutricionales alrededor del mundo, es la falta de hierro en la ingesta, la cual, junto con el desarrollo de enfermedades infecciosas, son las principales causas de anemias (2). Según la OMS, la desnutrición crónica ha disminuido con los años, sin embargo, se considera un desafío y uno de los problemas de salud pública a nivel nacional, la presencia de anemia en niños/as menores de 36 meses (3).

A raíz de ello, el estado peruano ha implementado diversas intervenciones y programas con la finalidad de contribuir a la mejora de este problema. Por ejemplo, el Plan Multisectorial de Lucha Contra la Anemia, elaborado por el MIDIS y otros ministerios, cuyo objetivo es disminuir de 43% a 19% la anemia en niños de 6 a 35 meses en el bicentenario. Para ello, se vienen desarrollando actividades estratégicas tales como: fortificación de alimentos con hierro, sesiones demostrativas-educativas en la preparación de alimentos (para niños y gestantes), entrega de suplementos de hierro y ácido fólico a mujeres adolescentes, visitas domiciliarias, entre otros (2).

Así mismo, desde hace algunos años, el MINSA (Ministerio de Salud) propone como tratamiento contra la anemia ferropénica, el empleo de sales ferrosas (sulfato y fumarato ferroso). Esto debido a que permite llegar a valores normales de concentración de hierro en sangre, saturación de transferrina y ferritina con una recuperación más rápida, así mismo, su costo es razonablemente bajo (4); sin embargo, se han presentado casos de baja adherencia a su consumo (5) (6) (7) (8), es por ello, que el presente estudio tiene como objetivo evaluar 3 nuevas fórmulas alimenticias que contienen quinua extruida, harina de arroz, suero de leche y hierro hemínico, en la búsqueda de encontrar alternativas de

tratamiento frente a la anemia ferropénica. Primero se realizó una evaluación de la toxicidad aguda oral de las 3 formulaciones alimenticias; y posterior a ello, su efecto antianémico en ratas con anemia inducida.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes internacionales

**Meneguetti et al. (2011)** evaluaron las propiedades físicas, químicas, contenido de aminoácidos y los efectos toxicológicos de la suplementación con extracto de quinua hidrolizada (HQ) en ratas sedentarias y ejercitadas. Utilizaron ratas Wistar macho para la evaluación toxicológica. Fueron asignadas aleatoriamente en cuatro grupos: (1) grupo sedentario (recibió HQ de 2000 mg/kg); (2) grupo sedentario, sin suplementos; (3) grupo suplementado con ejercicio (ratas sometidas a ejercicio físico aeróbico que recibieron 2000 mg/kg de HQ); y (4) grupo control ejercitado (ratas sometidas a ejercicio físico aeróbico, sin suplementos). Luego de 30 días, se analizaron a nivel sanguíneo, diversos indicadores para evaluar daño a nivel hepático y renal. Asimismo, se analizó los cambios en el peso corporal, la ingesta de alimentos y los depósitos de lípidos. Finalmente, los resultados indicaron no presencia de toxicidad renal ni hepática de HQ. También, en los grupos suplementados (grupos sedentarios y con ejercicio) se observó una disminución de la ingesta dietética, peso corporal, porcentaje de grasa y niveles de triglicéridos en sangre. Estos resultados sugieren a la HQ como uso potencial en nutrición humana (9).

**Tello-Palma et al. (2022)** evaluaron los efectos de la suplementación de hierro microencapsulado (hierro mineral) y hierro hemínico (hierro animal) en los niveles de Hb y el peso corporal en ratas anémicas. Se formaron cuatro grupos de estudio. Grupo control (GC), grupo experimental (GE1) (suplementación de hierro micro encapsulado MC), grupo experimental 2 (GE2) (suplementación de hierro hemínico) y grupo experimental 3 (GE3) (suplementación de hierro MC + hierro hemínico). Se administró al GC una dieta seca en polvo que contenía todos los nutrientes normales excepto el hierro. La suplementación se realizó durante 15 días (tres veces al día). Se evaluaron el peso, la

longitud y la hemoglobina (Hb) en el pretest y postest en similares condiciones. Los resultados indicaron que el GE1 aumentó significativamente la hemoglobina (14,3 %, Hb 2,1 g/dl) y el peso corporal (21,6 %, 25,8 g) ( $p < 0,05$ ) en el postest. De la misma forma, el GE2 incrementó significativamente la hemoglobina (14,5 %) y el peso corporal (44,5 %, 52,3 g) ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el GE3, a pesar de mezclar el hierro MC y hemínico, no logró superar la actuación individual en cada uno de los GE1 y GE2. Finalmente concluyeron que estos resultados sugieren que el hierro hemínico junto a la harina de quinua y cañihua podrían utilizarse como un nuevo suplemento de hierro seguro y eficiente en comparación con el hierro microencapsulado, dada su mayor biodisponibilidad de hierro y su capacidad de incrementar el peso corporal (10).

**Abdel-Reheim, et al. (2017)** evaluaron el posible efecto protector de la diosmina contra la lesión hepática inducida por sulfato ferroso en ratas albinas macho adultas. Los animales se distribuyeron en 6 grupos; grupo 1 = control normal (tween 80, p.o., 10 días), grupo 2 = control de N-acetilcisteína (300 mg/kg/día, p.o., 10 días), grupo 3 = control diosmina (20 mg/kg/día, p.o., 10 días), grupo 4 = sulfato ferroso (dos dosis de sulfato ferroso, 30 mg/kg/día, i.p., a los días 9 y 10), grupo 5 = N-acetilcisteína (300 mg/kg/día, p.o., 10 días) más sulfato ferroso (dos dosis de sulfato ferroso, 30 mg/kg/día, i.p., a los 9 y 10 días) y grupo 6 = diosmina (20 mg/kg/día, p.o., 10 días) más sulfato ferroso (dos dosis de sulfato ferroso, 30 mg/kg/día, i.p., en el día 9 y 10). El día 11 se recogieron muestras de sangre y tejido. Los resultados indicaron que la lesión hepática inducida por hierro, se evidenció por un aumento significativo en los marcadores de daño de la membrana de los hepatocitos (ALT, AST, ALP, GGT, LDH y bilirrubina en suero), marcadores oxidativos e inflamatorios (contenido de MDA hepático y producción de NOx) y marcadores dislipidémicos (TC en suero) y TG) ( $p < 0,05$ ). Además, se observaron disminuciones significativas en el contenido hepático de GSH y en la albúmina sérica ( $p < 0,05$ ). El tratamiento con diosmina mejoró significativamente los marcadores de daño de la membrana de los hepatocitos (mostrando reducciones que oscilan entre el 24 y el 48 %), los marcadores oxidativos e inflamatorios (mostrando reducciones del 34 % y el 32 % con respecto a MDA y NOx, respectivamente), los marcadores dislipidémicos (mostrando reducciones del 35 % y 39 % con respecto al suero TC y TG, respectivamente)

( $p < 0,05$ ). Finalmente, concluyeron que la diosmina puede tener un buen efecto hepatoprotector, principalmente a través de potenciales antioxidantes y antiinflamatorios (11).

**Guija et al. (2019)** evaluaron el efecto en hígado y cerebro de ratas, al administrar hierro hemínico y sulfato ferroso (junto con vitamina C). Para ello, se trabajó con ratas cepa Holtzman, a los cuales se les administró 4 mg de hierro elemental por kilogramo de peso corporal, bajo la forma de hierro hemínico o sulfato ferroso (SF) + 10 mg de vitamina C. El tratamiento duró 7 días. Al finalizar el tratamiento, se sacrificaron a los animales para poder extraer cerebro, hígado, sangre, para realizar cortes histológicos y medir en suero la capacidad antioxidante. Pudieron observar que el cerebro de los animales tratados con hierro hemínico y SF + vitamina C no padecieron de ningún tipo de alteración significativa. Sin embargo, se vio mayor daño hepático en los animales tratados con SF + vitamina C que los tratados con hierro hemínico (12).

**Robles et al. (2020)** determinaron el efecto de dietas formuladas con leche fermentada de cabra y vaca, sobre la recuperación de anemia en 60 ratas machos cepa *Wistar*. Los animales fueron distribuidos en un control (dieta con un aporte de hierro normal de 45 mg/kg) y un grupo experimental (dieta con bajo hierro de 5 mg/kg). Luego, durante 30 días, ambos grupos fueron alimentados con dietas elaboradas con leche fermentada de cabra y vaca. Los animales que fueron alimentados con leche de cabra, presentaron una recuperación de hemoglobina más eficaz al presentar un hematocrito (23,7 %) y hemoglobina (6,2 g/dL) superior al grupo control. Finalmente, se concluyó que, en el grupo tratado con leche de cabra, se redujo con mayor eficacia los niveles de anemia, así también, disminuyó la adiposidad y el peso corporal (53).

**Estrada y estrella (2020)** evaluaron el efecto de la harina de cañihua y quinua, sobre ratas anémicas cepa Holtzman. Así mismo, la composición proximal, toxicidad aguda de ambas harinas. Los resultados evidencian se evidenció un alto porcentaje de proteínas de quinua (22%) y de cañihua (16%). Así mismo, la prueba de toxicidad indicó que, utilizando una dosis máxima de 15 000 mg/kg, ambas harinas fueron seguras e inocuas. También se evidenció un incremento de los niveles de hematocrito de  $24,5 \pm 0,5$  % (harina



de quinua) y  $22,1 \pm 0,3$  % (harina de cañihua) con un  $p \leq 0,05$ , mostrando una actividad antianémica (13).

**Anaya, et al. (2020)** formularon galletas antianémicas a base de quinua y hierro hemínico en diferentes concentraciones; y evaluaron su efecto antianémico en ratas Holtzman". La inducción de anemia se llevó a cabo durante cinco semanas a través de una dieta deficiente de hierro (a base de maíz). Se formularon dos tipos de dieta, formulación 1 y formulación 2, ambas con una concentración diferente de quinua y sangre bovina. Se utilizó 30 ratas machos de seis meses. Se formaron 3 grupos de 10 ratas en cada uno, 1 grupo control y 2 grupos experimentales. El primer grupo experimental recibió galletas de la formulación 1, y el segundo grupo, galletas de la formulación 2, durante cinco semanas. Finalmente, el promedio del nivel de hemoglobina de los 3 grupos experimentales fue significativamente diferente, siendo mayor el grupo que recibió la formulación 2 (15,66 g/dL), esto debido a que la formulación 2 tuvo un mayor porcentaje de harina de quinua y sangre (por ende, mayor contenido de hierro y proteína). Concluyeron que las galletas antianémicas están disponibles para consumo humano, ya que cumplieron con los requerimientos nutricionales, y que se reduce la anemia con niveles adecuados de quinua y hierro hemínico bovino (14).

## 2.2 Antecedentes nacionales

**Amaro, et al. (2019)** determinaron la actividad antianémica del extracto de quinua sobre ratones con anemia inducida. Para ello, usaron treinta ratones machos cepa *Balb/c* con un peso corporal de 23 - 32 gramos. Los grupos fueron divididos en: a) grupo control negativo (recibieron alimento balanceado); b) grupo control positivo (40g/d de dieta ferropénica); y, c) grupo experimental (40g/d de dieta ferropénica). El tratamiento tuvo una duración de 7 semanas. Al grupo experimental, a partir de la quinta semana, se le añadió 20g/d del extracto de quinua. Los resultados indicaron que el grupo que recibió el extracto de quinua, tuvo un incremento significativo (de 2,1 g/dL más) en sus niveles de hemoglobina a diferencia del grupo control positivo. Finalmente concluyeron que la quinua tiene un efecto antianémico, reforzado por los resultados en los niveles de hemoglobina (15).

**Lozano, (2019)** determinó el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas en ratas anémicas y la capacidad antioxidante. Para ello, se utilizó treinta ratas machos cepa Holtzman, los cuales tenían dos meses de edad. Utilizó el método depleción - repleción de la hemoglobina para inducir la anemia (sangrado periódico más dieta libre de hierro). El tratamiento duró 21 días y se formaron 5 grupos: a) Control negativo, b) Control positivo, c) Mezcla MV (fumarato ferroso: 3 mg de hierro/Kg + Zn, vitamina A, vitamina C, d) Sulfato ferroso (3 mg de hierro/kg) y e) Hierro hemínico (3 mg de hierro/kg). Los grupos c, d y e tuvieron una recuperación la hemoglobina similar a los valores basales. Finalmente concluyeron que los grupos (c), (d) y (e) presentaron un efecto antianémico. Asimismo, se afectó la capacidad antioxidante de los grupos tratados con hierro iónico a diferencia del grupo tratado con hierro hemínico. Por otro lado, se observó una mayor alteración a nivel celular, especialmente en hígado, del grupo que recibió sulfato ferroso (16).

## **2.3 Bases teóricas**

### **\* Anemia y hemoglobina**

La anemia es un trastorno que se distingue por presentar una cantidad de glóbulos rojos, y nivel de hemoglobina, por debajo de la concentración necesaria para los procesos fisiológicos normales de cuerpo humano, según sexo, edad y altura sobre el nivel del mar (17).

La hemoglobina es considerada una hemoproteína que contiene hierro y se produce en los eritrocitos. Su función principal es transportar oxígeno y CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) por medio de la sangre (18). Existen diversos tipos de anemia, entre ellas, anemia aplásica, anemia de células falciformes, por deficiencia de vitaminas (B12), talasemia, anemia ferropénica, etc. Cada una con sus propias etiologías, aunque usualmente la anemia es multicausal. Cabe mencionar que no es considerada una enfermedad, sino un síntoma de varios trastornos como: pérdida profusa de sangre, destrucción excesiva de glóbulos rojos o formación insuficiente de estos, etc. A menudo es síntoma de un proceso patológico, por ello siempre se debe investigar su origen (17).

### **\* Anemia ferropénica**

Es la anemia que se caracteriza por presentarse con mayor frecuencia. Se origina en el organismo cuando por un largo tiempo, no se ha presentado la suficiente cantidad de hierro. De hecho, la principal causa de anemia a nivel mundial se estima que es la deficiencia de hierro es (19). Debido al rápido crecimiento que presentan los lactantes mayores (6 y 24 meses de edad), es frecuente que presenten este tipo de anemia, ya que se incrementa las necesidades de hierro, mucho más que en otro período de vida. Presentar bajo peso al nacer, el bajo consumo de alimentos complementarios ricos en hierro, el elevado consumo de leche de vaca, la clase socioeconómica baja y la condición de inmigrante, entre otros, son algunos de los factores de riesgo que están relacionadas con una mayor prevalencia de anemia ferropénica (17).

### **\* Manifestaciones clínicas**

Debido a que la deficiencia de hierro perjudica a diversos órganos y tejidos, las manifestaciones clínicas que se presentan, pueden ser variadas, y muchas veces guardan relación con el tiempo de duración de la enfermedad. Se ha observado que, cuando la anemia lleva mucho tiempo en el organismo, la mayoría de las manifestaciones no están presentes o lo están en forma muy atenuada. Algunas se presentan de manera pasajera y reversibles, mientras que otras pueden ser permanentes e irreversibles, si se producen en los primeros años de vida. Entre los síntomas generales se puede presentar: palidez de piel y mucosas, decaimiento, cansancio precoz, dolor de cabeza, disminución de la capacidad de concentración, hipersensibilidad al frío, náuseas, etc. (20).

### **\* Diagnóstico**

A menudo el diagnóstico de anemia se realiza tras comprobar si el nivel de hemoglobina y/o hematocrito está por debajo de -2 desviaciones estándar.

Según los criterios de la OMS (Organización Mundial de la Salud), se debe presentar tasas de hemoglobina por debajo a 13 g/dL en hombres, 12 g/dL en mujeres en edad fértil y 11 g/dL en gestantes, para presentar anemia (21).

Para un diagnóstico presuntivo de anemia ferropénica, se puede llevar a cabo una serie de exámenes como: evaluar nivel de ferritina y transferrina en sangre. Asimismo, se pueden

realizar otros test analíticos como la Protoporfirina Eritrocitaria Libre (PEL), la cual es de mucha ayuda para los ensayos de screening de la deficiencia de hierro y en la medición de la concentración sérica del Receptor Tisular de la Transferrina (sTfR). Finalmente, el gold estándar para determinar la deficiencia de hierro en sangre, es la tinción de Perls que se realiza en la médula ósea. Cabe resaltar que estos test diagnósticos pueden variar de manera particular y ser diferente en cada estadio de la anemia ferropénica (22).

### **\* Tratamiento**

El objetivo del tratamiento debe ser: revertir la anemia, corregir su principal causa y asegurar los depósitos de hierro en el cuerpo humano (20). En búsqueda de corregir la causa primaria, se puede llevar a cabo las siguientes alternativas: llevar una dieta equilibrada, tratamiento contra parásitos, controlar el reflujo gastroesofágico, manejar del síndrome de malabsorción, evaluar si hay pérdidas de sangre ocultas, etc. Para llevar a cabo el tratamiento con hierro, este puede ser administrado por vía oral o parenteral, ambas vías con similar eficacia y ritmo de ascenso de la hemoglobina. Si la elección es por vía oral, la dosis recomendada es de 3-6 mg de hierro elemental/kg de peso corporal/día, fraccionada en 1 a 3 tomas diarias. De preferencia se usa el sulfato ferroso como preparado de elección, el cual no se debe de administrar junto con las comidas, si no 30 minutos antes o dos horas después. En caso de presentar intolerancia (náuseas, constipación, diarrea, vómitos, dolor abdominal, etc.), se puede utilizar otro preparado como el hierro polimaltosa, por presentar una mejor tolerancia. Con respecto al tiempo de administración, cuando se alcanzan valores normales de hemoglobina y hematocrito, debe de continuarse la administración (con misma dosis), el mismo tiempo que tomó llegar a la normalización. Esto con la finalidad de reponer los depósitos de hierro. Por otro lado, se utiliza la vía parenteral en casos donde no haya tolerancia digestiva al hierro por vía oral, se presente alguna patología digestiva donde esté contraindicado la ingesta oral o ante la sospecha de que el tratamiento oral es insuficiente o inadecuado (20).

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **3.1 Fundamento teórico**

La Anemia es un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta particularmente a la población infantil menor de 18 meses, niños menores de 5 años y embarazadas, incluso a adultos de la tercera edad (23). En los últimos años, los organismos nacionales como el: Ministerio de Salud (24), Instituto Nacional de Salud (25), Ministerio de Agricultura (26), Ministerio de Economía y Finanzas y Gobiernos Locales (27), entre otros; han planteado intervenciones articulados a nivel nacional con el fin de disminuir su prevalencia y costo social, afectando desde un 2.2% a un 21.94% del PBI según el departamento peruano (28) (29).

Muchos autores han referido que la prevalencia de anemia, durante la pandemia, no se ha incrementado (30). Sin embargo, según el Informe de Perú: Indicadores de Resultados de los Programas Presupuestales, 2022; se menciona que la prevalencia de anemia sí se ha incrementado, llegando a afectar al 42.4% en niñas y niños de 6 a 35 meses, cifra superior a lo reportado en el año 2021 (31) (anexo 7).

En el caso de gestantes, el panorama es similar. La prevalencia de anemia, en el año 2019, era del 18,5%, siendo en la actualidad, en el 2022, el 20,3% (32). Sin embargo, ante tal prevalencia, una adecuada intervención no es sencilla, ya que algunos autores la consideran un síndrome, debido a su multicausalidad y factores asociados que la predisponen, e incluso nueva evidencia menciona el papel que cumplen los procesos inflamatorios, de altura y de hemodilución; en su misma definición y criterio de diagnóstico (33–36).

Las anemias nutricionales, son causadas mayormente por un bajo consumo de hierro en la dieta y nutrientes hematopoyéticos (vitamina B9, vitamina B12, etc.), necesarios para sintetizar la hemoglobina (37). El hierro es considerado un mineral necesario y primordial para el funcionamiento del metabolismo energético y oxidativo de los seres vivos (38). Cumple con diversas funciones como: la producción de energía celular, el intercambio de

oxígeno y CO<sub>2</sub> en los tejidos, desarrollo y función del sistema nervioso, metabolismo de los neurotransmisores, mielinización (formación de vaina de mielina), desarrollo fetal y placentario, etc. Por tanto, la anemia ferropénica, especialmente la moderada o severa, se asocia a una menor capacidad física, menor productividad y menor desarrollo motor, cognitivo y conductual (19). Así mismo, se han descrito otras manifestaciones que están relacionadas con la alteración de enzimas hierro dependiente, tales como, disminución de la termogénesis, alteraciones de la inmunidad celular, falla en la movilización de la vitamina A hepática, alteraciones en el tubo digestivo a nivel funcional e histológica, y demás (39).

La principal solución propuesta por el plan nacional para la reducción y control de la anemia materno infantil y la desnutrición crónica infantil en el Perú, que articula al MINSA, MEF, MINAGRI y Gobiernos Locales, resulta en la administración de sales ferrosas como principal arma de tratamiento y prevención (24–27). Estrategias que implican cerca de un presupuesto menor a 0,01% del PBI nacional (28). Sin embargo, menos del 50 % de los niños entre 6 a 35 meses de edad lo consumen.

### **3.2 Formulación del problema**

¿Cuál es el efecto tóxico agudo y el efecto sobre los niveles de hemoglobina de tres fórmulas alimenticias que contienen quinua extruida, harina de arroz, suero de leche y hierro hemínico en ratas inducidas a anemia ferropénica?

## **IV. JUSTIFICACIÓN**

Según ENDES 2022, sólo el 34.2% de niñas y niños de 6 a 35 meses consumen suplemento de hierro en los últimos 7 días que reparte el MINSA a todos los infantes de manera obligatoria (31). Esto podría deberse, en parte, por la falta de adherencia en su consumo. Nieva-Villegas y Soriano-Camargo (2019), demuestran que existe una negación por parte de las madres a la suplementación con micronutrientes por la presencia de efectos secundarios (5). De igual manera ocurre con la suplementación de sulfato

ferroso, debido a las reacciones adversas que puede generar (náuseas, estreñimiento, pirosis, etc.) (6). En un estudio descriptivo, se evaluaron factores asociados a la suplementación en madres gestantes en un hospital de Lima, y se llegó a determinar que hubo una asociación entre la administración sulfato ferroso en mujeres con la mayor frecuencia de síntomas gastrointestinales con una baja adherencia al tratamiento (7). Asimismo, Valdivia *et al.* (2015) realizaron encuestas a 314 puérperas del servicio de obstetricia del hospital Hipólito Unanue (Tacna), con el objetivo de determinar los factores que influyen en la adherencia a la suplementación con sulfato Ferroso durante el embarazo, llegando a la conclusión de un alto porcentaje de las embarazadas participantes (76,8%) no completaron el esquema de suplementación de hierro; siendo el estreñimiento, las náuseas y la cefalea uno de los factores que influyeron en la baja adherencia (8). Así mismo, son muchos los estudios que revelan los efectos adversos de la suplementación de sales ferrosas sobre hepatotoxicidad (13,16), alteración de la microbiota intestinal (40–44) y efectos adversos gastro intestinales, tales como mayores episodios de diarrea en niños menores de 36 meses (45).

A raíz de esta problemática que aún se observa a nivel nacional, se vienen desarrollando suplementos/productos ricos en hierro hemínico, tales como: galletas elaboradas con harina de trigo, camu-camu y sangrecita (46), gomitas a base de aguaymanto y sangre de cuy (47), galletas ricas en hierro (a base de quinua, puré de sangre bovina, kiwicha, chía y cacao) (48), etc. Sin embargo, a pesar de ser aparentemente beneficiosos para revertir la anemia, muchos de ellos no han realizado algún ensayo experimental que lo demuestre. Así mismo, no hay alternativas a la suplementación con sales ferrosas de consumo másico a nivel nacional. Por lo tanto, hay una demanda de nuevas investigaciones por la falta de investigación en el campo de nuevas fórmulas alimenticias. Es allí, donde la intervención nutricional con hierro hemínico se plantea como una opción dietoterapéutica para combatir la anemia.

Esto nos lleva a cuestionarnos, ¿qué sucede con cerca del 65.8% de niñas y niños cuyos padres y/o cuidadores deciden no darles a consumir las sales ferrosas por falta de aceptabilidad u efectos adversos que presentan? Es por ello que se busca evaluar 3 fórmulas alimenticias fortificadas con hierro hemínico, ácido fólico, vitamina B12, camu

camu, inulina, espirulina, prebióticos y probióticos, en tres matrices alimenticias a base de quinua extruida, harina de arroz y suero de leche; todo ello para contribuir en disminuir la prevalencia de anemia y de esta manera contribuir a mejorar el desarrollo integral infantil y ofrecer una mejor calidad de vida. Todo ello justifica el desarrollo de la presente investigación. Así mismo, con los resultados de la presente investigación en modelos animales, se proporcionará información preclínica necesaria para, en un futuro, diseñar pruebas en humanos.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Evaluar la toxicidad aguda y el efecto sobre la anemia ferropénica inducida en ratas, de tres fórmulas alimenticias que contienen quinua extruida, harina de arroz, suero de leche y hierro hemínico.

### **5.2 Específicos**

1. Determinar el efecto tóxico agudo de las tres fórmulas alimenticias.
2. Determinar el efecto de las tres fórmulas alimenticias sobre los niveles de hemoglobina en ratas con anemia inducida.
3. Determinar el efecto de las tres fórmulas alimenticias sobre el peso corporal en ratas con anemia inducida.
4. Determinar cuál de las 3 fórmulas alimenticias presenta un mejor efecto antianémico en ratas con anemia inducida.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 Diseño metodológico**

- El estudio fue de tipo experimental, cuantitativo y prospectivo.



## **6.2 Variables**

### **❖ Variable dependiente:**

- Nivel de hemoglobina.
- Toxicidad aguda
- Peso corporal

## **6.3 Operacionalización de variables**

Consiste en un conjunto de técnicas y métodos que permiten medir las variables en una investigación (62). En la tabla 1 se presenta la operacionalización de cada variable dependiente: la definición conceptual, definición operacional, escala de medición e instrumento.

**Tabla 1. Operacionalización de variables dependientes**

<b>Variables</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Instrumento</b>
Nivel de hemoglobina	Cantidad de hemoglobina en la sangre en unidades de g/dL de las ratas de experimentación (17).	Niveles de hemoglobina en sangre Normal (49): 12,3 – 15,44 g/dL Anémico: < 12,3 g/dL	Razón continua	Kits de determinación de hemoglobina (hemogloWiener).
Peso corporal	El peso es la fuerza con la que los cuerpos son atraídos hacia el centro de la tierra por acción de la gravedad, en este caso referido a las ratas de experimentación.	No aplica	Razón continua	Balanza analítica
Toxicidad aguda	Efectos adversos que ocurren después de la administración oral de una dosis única de una sustancia o dosis múltiples administradas dentro de las 24 horas (49).	Variación del peso corporal Signos clínicos Presencia/ausencia de Mortalidad	Razón continua Nominal Nominal	Balanza analítica Ficha de datos experimentales para toxicidad aguda (anexo 6)

Fuente: Elaboración propia

### 6.3 Animales de experimentación

Se utilizaron 78 ratas albinas cepa Holtzman, sanas con un peso promedio de 200 a 250 g, de 2 meses de edad, provenientes de las instalaciones del bioterio del LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El uso de los animales en la presente investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia mediante la constancia 039-12-20 del 14 de octubre de 2020.

#### 6.3.1 Condiciones de hábitat y alimentación

La sala de experimentación de los animales estuvo bajo las siguientes condiciones: 20-25°C de temperatura, humedad relativa <70% y la iluminación fue artificial, con un fotoperiodo de luz y oscuridad de 12 horas (46). La alimentación estuvo constituida por un alimento balanceado, especial para ratas, obtenido de la Universidad Nacional Agraria La Molina y fue brindada de acuerdo al tratamiento de cada grupo experimental. Finalmente, el agua fue administrada *ad libitum*.

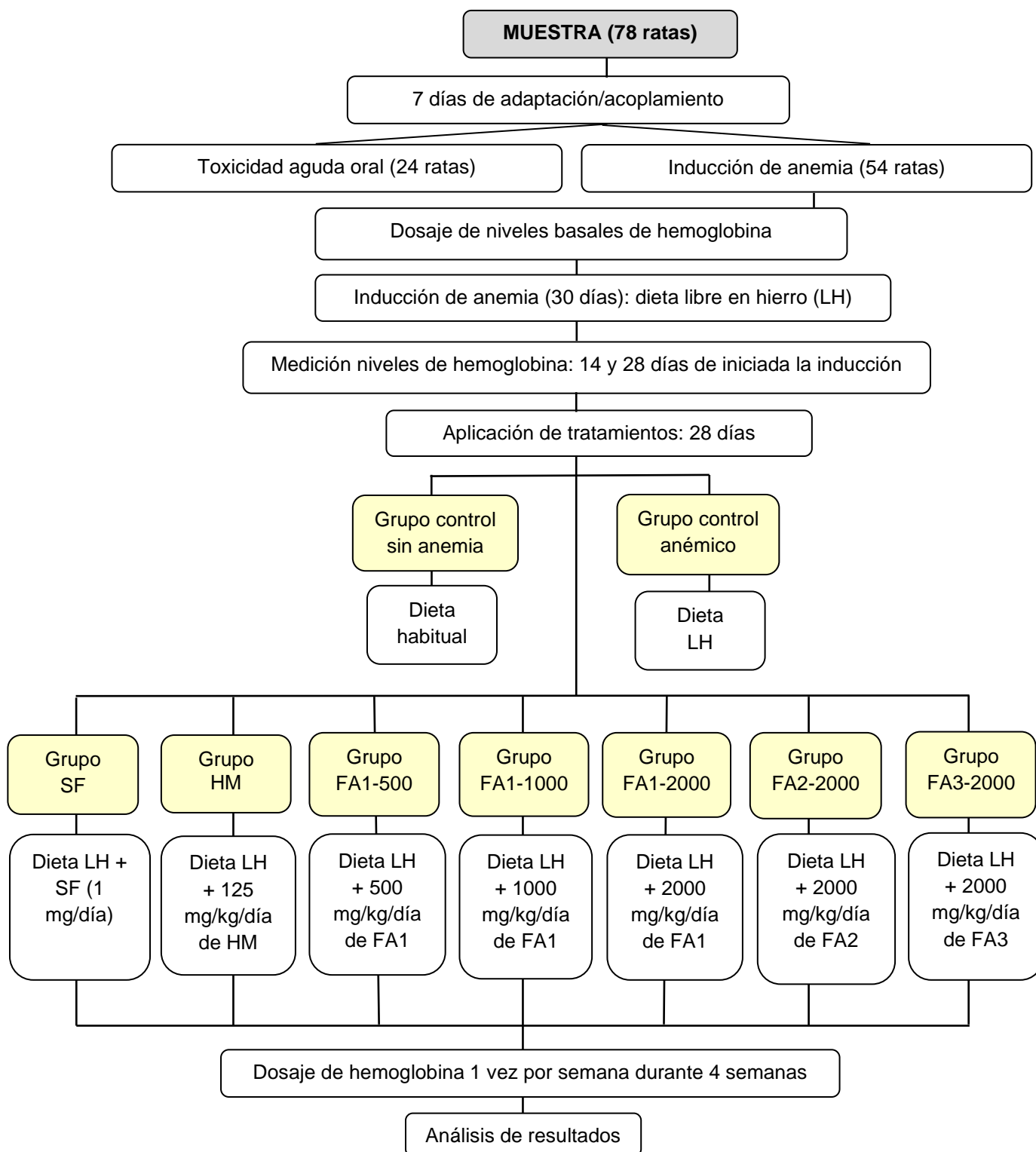
#### 6.3.2 Preparación de los animales

Los animales fueron seleccionados, presentando pesos similares, marcados para permitir su identificación individual, y ocupando sus respectivas jaulas, 7 días anteriores al inicio del tratamiento para permitir la aclimatación a las condiciones del medio.

#### 6.3.3 Criterios

<b>Criterio de inclusión:</b>	<b>Criterio de exclusión:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ratas cepa Holtzman</li><li>• Ratas de 2 meses de nacidos</li><li>• Ratas sanas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ratas que presenten algún defecto de nacimiento</li><li>• Ratas que no lleguen a terminar el tratamiento</li><li>• Ratas que fueron sometidas a algún tratamiento experimental</li></ul>

## 6.4 Diseño experimental



## **6.5 Etapa experimental**

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo) en la Unidad de Servicio de Control y Calidad, en el ambiente de experimentación para ratas del área de modelos biológicos y toxicológicos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

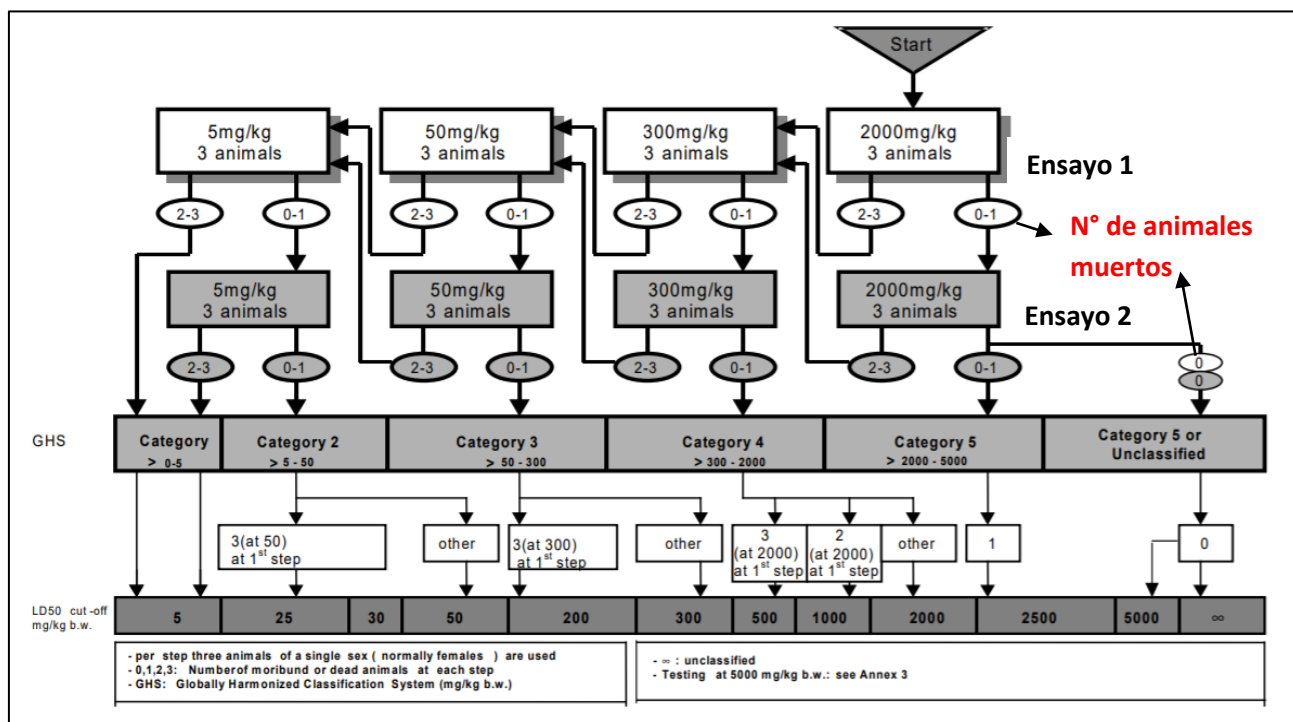
### **6.5.1 Toxicidad aguda**

La evaluación tuvo una duración de 28 días en total y se utilizaron 24 ratas hebras. Se utilizó como referencia la guía n°423 regulada bajo la normativa de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) para el ensayo de toxicidad aguda oral en ratas, específicamente el flujograma de procedimiento de prueba con una dosis inicial de 2000 mg/kg de peso corporal (figura 1) (50).

Los animales estuvieron en ayunas (se les corto la comida, durante toda la noche anterior, pero no el agua). Posterior a ello, fueron pesados para hacer la dosificación y la posterior administración de cada formulado (FA1, FA2 y FA3). Se agruparon de manera aleatoria en cuatro grupos (cada uno con tres ratas): un grupo control (agua destilada) y tres con las fórmulas alimenticias a evaluar (grupo FA1, grupo FA2 y grupo FA3). La dosis inicial de cada fórmula fue de 2000 mg FA/kg, la cual fue administrada por vía oral, usando una sonda de acero inoxidable de terminación redonda, para evitar daño en la boca y/o esófago al momento de la administración.

Para el primer ensayo (ensayo 1), se aplicó la dosis inicial y cada grupo fue observado por un tiempo de 72 horas hasta el día 14. Luego, se repitió el ensayo (ensayo 2) bajo las mismas condiciones, pero en diferentes animales y se hizo nuevamente un seguimiento por 14 días.

**Figura 1. Flujoograma de procedimiento de prueba con una dosis inicial de 2000 mg/kg de peso corporal, según la guía n°423 de la OECD**



Fuente: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method n°423 (50)

El seguimiento de los animales, de cada ensayo, se llevó a cabo al menos una vez al día y se observó mortalidad, conductas anormales (alteración en la actividad motriz, postración, depresión, irritabilidad) y presencia de signos clínicos de toxicidad (salivación, convulsión, piloerección, disnea, diarrea, entre otros). Las observaciones fueron anotadas en fichas de datos (tabla 7, Anexo 6).

Se registraron los pesos corporales de las ratas de todos los grupos, en el basal y en el día 7 y 14 posteriores a la administración de la dosis inicial. Al finalizar con los ensayos, los animales fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical por un personal capacitado.

### 6.5.2 Actividad antianémica

Se utilizaron 54 ratas machos en total. Posterior a la etapa de aclimatación (7 días), se utilizó el método de depleción-repleción de la hemoglobina (51).

La fase de “depleción” consiste en disminuir los niveles de hemoglobina por debajo de los valores fisiológicos considerados normales propias de la especie mediante una dieta libre de hierro (tabla 2). Mientras que, la fase de “repleción”, consiste en elevar nuevamente los niveles de hemoglobina hasta valores fisiológicamente normales (tabla 3), mediante el suministro de diferentes fuentes de hierro, ya sea en forma de formulados, productos naturales o productos farmacéuticos (51).

#### \* Fase de depleción:

Se elaboró una dieta libre de hierro manualmente, de acuerdo a los requerimientos de las ratas (tabla 4), según lo descrito por Acosta A.E y Campano S.C (59). Esta dieta estuvo constituida de claras de huevo (16 g), maicena (11,6 g) y aceite vegetal (1,45 ml) (tabla 2). La dieta libre de hierro fue administrada por 30 días diariamente mediante una sonda nasogástrica.

**Tabla 2. Dieta experimental libre de hierro**

Alimento	Cantidad (g)	Calorías (Kcal)	Proteínas (g)	Grasas (g)	CHO (g)	Hierro (mg)
Clara de huevo	16.00	7.78	1.73	0.03	0.14	0
Maicena	11.60	40.72	0.07	0.02	10.06	0
Aceite vegetal	1.45 ml	13.05	0.00	1.45	0.00	0
Total	29.05	61.55	1.8	1.50	10.20	0

Fuente: Acosta A.E, Campano S.C 2004 (59)

### **\* Fase de repleción:**

Después de verificar que los animales presentaban anemia ferropénica ( $Hb < 12,3$  g/dL), se formaron 9 grupos de manera aleatoria (con 6 animales en cada uno) y se dio inicio a los tratamientos con dosis de 2000 mg FA/kg (FA1-2000, FA2-2000 y FA3-2000). El formulado que contenía quinua (FA1), fue evaluado su efecto dosis-respuesta con dosis adicionales de 500 mg FA1/kg y 1000 mg FA1/kg. Se contó además con 2 grupos controles (ratas sanas y anémicas) y 2 grupos tratados con: sulfato ferroso (SF) e hierro hemínico (HM), como se indica a continuación:

- 1. Grupo control sin anemia:** control negativo, ratas sanas con dieta habitual.
- 2. Grupo control anémico:** ratas anémicas con dieta libre de hierro.
- 3. Grupo SF:** ratas anémicas con dieta libre de hierro y 1 mg de SF al día (0.3 mg Fe).
- 4. Grupo HM:** ratas anémicas con dieta libre de hierro y 125 mg/kg de HM (0.25 mg Fe/kg).
- 5. Grupo FA1-500:** ratas anémicas con dieta libre de hierro y 500 mg de FA1/kg de peso corporal (0.35 mg Fe/kg).
- 6. Grupo FA1-1000:** ratas anémicas con dieta libre de hierro y 1000 mg de FA1/kg de peso corporal (0.7 mg Fe/kg).
- 7. Grupo FA1-2000:** ratas anémicas con dieta libre de hierro y 2000 mg de FA1/kg de peso corporal (1.4 mg Fe/kg).
- 8. Grupo FA2-2000:** ratas anémicas con dieta libre de hierro y 2000 mg de FA2/kg de peso corporal (1.4 mg Fe/kg).
- 9. Grupo FA3-2000:** ratas anémicas con dieta libre de hierro y 2000 mg de FA3/kg de peso corporal (1.4 mg Fe/kg).



## \* Productos utilizados:

- **FA1 (fórmula alimenticia 1):** fórmula alimenticia en polvo, a base de quinua extruida, hierro hemínico bovino en polvo, cacao en polvo, inulina vegetal de achicoria, harina micropulverizada de camu camu y espirulina en polvo. Obtenido/fabricado por ADN BIOLOGICAL NUTRITION E.I.R.L.  
(100 g de FA1 aporta 70 mg de Fe)
- **FA2 (fórmula alimenticia 2):** fórmula alimenticia en polvo a base de harina de arroz, hierro hemínico bovino en polvo, cacao en polvo, inulina vegetal de achicoria, harina micropulverizada de camu camu y espirulina en polvo. Obtenido/fabricado por ADN BIOLOGICAL NUTRITION E.I.R.L.  
(100 g de FA2 aporta 70 mg de Fe)
- **FA3 (fórmula alimenticia 3):** fórmula alimenticia en polvo a base de proteína de suero de leche, hierro hemínico bovino en polvo, cacao en polvo, inulina vegetal de achicoria, harina micropulverizada de camu camu y espirulina en polvo. Obtenido/fabricado por ADN BIOLOGICAL NUTRITION E.I.R.L.  
(100 g de FA3 aporta 70 mg de Fe)
- **SF (sulfato ferroso):** sulfato ferroso monohidratado USP, fabricado por FERROSALT S.A., insumo químico 100% soluble de fórmula  $\text{FeSO}_4$ . Se encuentra casi siempre en forma de sal hepta-hidratada (100g de sulfato ferroso monohidratado equivale a 31.62 g de Fe).
- **HM (hierro hemínico):** hemínico bovino en polvo, obtenido por ADN BIOLOGICAL NUTRITION E.I.R.L (1 g de HM aporta 2 mg de Fe)

Una vez concluido con los tratamientos, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis con pentobarbital sódico, duplicando la dosis farmacológica del efecto sedante (1 ml por 2,5 kg de peso del animal).

### **\* Extracción y medición de sangre**

Se realizaron las extracciones de sangre a través del método por punción del seno retro-orbital. La primera extracción fue previa a la inducción de anemia, donde se tuvieron los valores normales de los animales de experimentación. La segunda y tercera extracción (a los 14 y 28 días posteriores al inicio de la inducción), para verificar si la inducción de anemia fue efectiva. Finalmente, se realizó una vez por semana, durante 4 semanas, después de haber iniciado la administración de las muestras en sus respectivas concentraciones, para determinar la efectividad de los tratamientos.

Para la extracción de sangre según el método usado, los animales fueron anestesiados usando Pentobarbital sódico (5 mg/kg). Luego, fueron sujetadas para insertar el capilar en el ángulo externo del ojo (2 mm aproximadamente) y se giró suavemente hasta que la sangre fluya por el mismo. Se recogió la muestra de sangre en tubos con EDTA (anticoagulante) y se retiró el capilar. Finalmente, para la medición de los niveles de hemoglobina, se utilizó una técnica colorimétrica mediante el uso de kits de determinación de hemoglobina (hemogloWiener).

## **6.6 Análisis estadístico**

Los resultados están presentados en medias con error estándar. Para la comparación de los grupos experimentales se aplicó la prueba de ANOVA y una prueba post-test Bonferroni. En caso de no cumplir con la normalidad y homogeneidad de las varianzas, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis por rangos y una prueba post-test dunnett. Se considero un valor  $p < 0.05$  para que sea estadísticamente significativo. Para la evaluación de los resultados se empleó el paquete estadístico STATA versión 16.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Toxicidad aguda:

Las tres fórmulas alimenticias (FA1, FA2 y FA3) administradas por vía oral no mostraron mortalidad (en ambos ensayos) luego de ser administrados a una dosis de 2000 mg FA/kg, como se observa en la tabla 5.

**Tabla 5. Toxicidad aguda: Registro de mortalidad en las ratas.**

<b>Grupos</b>	<b>Dosis (mg/Kg)</b>	<b>Mortalidad (Muertos/Total)</b>
Control	Agua destilada	0/3
<b>Fórmulas alimenticias (ensayo 1)</b>		
Grupo FA1	2000 de FA1	0/3
Grupo FA2	2000 de FA2	0/3
Grupo FA3	2000 de FA3	0/3
<b>Fórmulas alimenticias (ensayo 2)</b>		
Grupo FA1	2000 de FA1	0/3
Grupo FA2	2000 de FA2	0/3
Grupo FA3	2000 de FA3	0/3

No se evidenció diferencia significativa entre los pesos de todos los grupos tratados, tanto al inicio del estudio (basal) como en las semanas posteriores. Asimismo, no se reportó un cambio estadísticamente significativo con respecto a la ganancia de peso después de 14 días de tratamiento como se observa en la tabla 6 y 6.1.

**Tabla 6. Toxicidad aguda: Peso corporal de ratas (g) según tratamiento (primer ensayo)**

	Fórmulas alimenticias				
	Control negativo <sup>a</sup>	Grupo FA1 #	Grupo FA2 #	Grupo FA3 #	p <sup>q</sup>
<b>Basal</b>	225.3±1.4	220.6±0.8	220.6±1	223.52±1.2	0.32
<b>7 días</b>	227.3±0.85	226.2±1.4	226.3±1.3	229.6±0.8	0.35
<b>14 días</b>	234±1.5	231.4±0.76	231±1.5	236.4±1	0.07
<b>Ganancia de peso</b>	8.7±1	10.9±0.25	10.3±0.78	12.9±0.24	0.10

<sup>q</sup> Prueba ANOVA. # Recibió una dosis de 2000 mg FA/Kg de peso. <sup>a</sup> Recibió agua destilada

**Tabla 6.1 Toxicidad aguda: Peso corporal de ratas (g) según tratamiento (segundo ensayo)**

	Fórmulas alimenticias				
	Control negativo <sup>a</sup>	Grupo FA1 #	Grupo FA2 #	Grupo FA3 #	p <sup>q</sup>
<b>Basal</b>	220.3±1.1	221.8±0.82	220.7±1.4	222.7±0.8	0.38
<b>7 días</b>	225.3±0.83	227.6±1.2	224.3±1.2	226.6±1.4	0.33
<b>14 días</b>	232±1.2	232.5±1.6	233.4±1.27	235.2±1.31	0.09
<b>Ganancia de peso</b>	11.7±1	10.6±0.82	12.7±1.17	12.5±0.60	0.15

<sup>q</sup> Prueba ANOVA. # Recibió una dosis de 2000 mg FA/Kg de peso. <sup>a</sup> Recibió agua destilada

Ningún animal (en ambos ensayos) evidenció signos clínicos de toxicidad ni conductas anormales en la dosis ensayada de 2000 mg/kg durante los 14 días de seguimiento (anexo 6). Por lo tanto, la DL50 (dosis letal media) por vía oral para los tres formulados es mayor a 2000 mg de FA/Kg de peso corporal.

## 7.2 Actividad antianémica

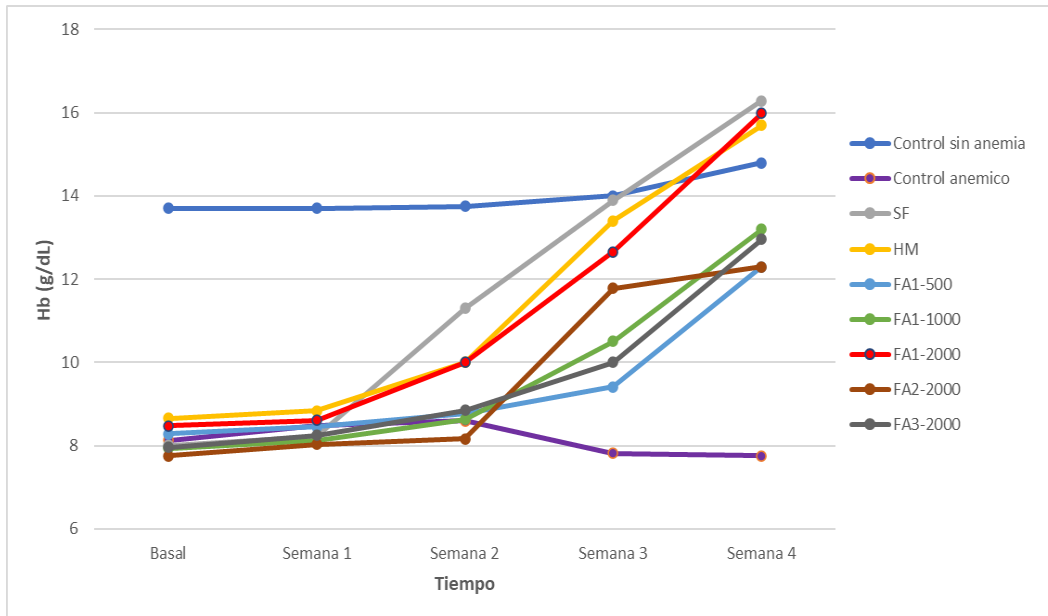
En la segunda parte del presente estudio, se evaluó el efecto de las tres fórmulas alimenticias (FA1, FA2 y FA3) sobre el nivel de hemoglobina y el peso corporal en ratas con anemia inducida.

En la tabla 8 se puede observar que desde el basal (inicio) hasta la semana 3, el peso promedio del grupo control sin anemia fue mayor y significativamente diferente con respecto a todos los grupos de tratamiento ( $p < 0.05$ ). Para la semana 4, el resultado fue similar, con excepción del grupo SF y FA1-2000 ( $P < 0.05$ ). En relación al grupo control anémico; durante el basal, semana 1 y semana 3 presentó diferencia significativa del peso con respecto a todos los grupos de tratamiento. En la semana 2 y semana 4, el resultado fue similar, con excepción del grupo SF ( $p > 0.05$ ).

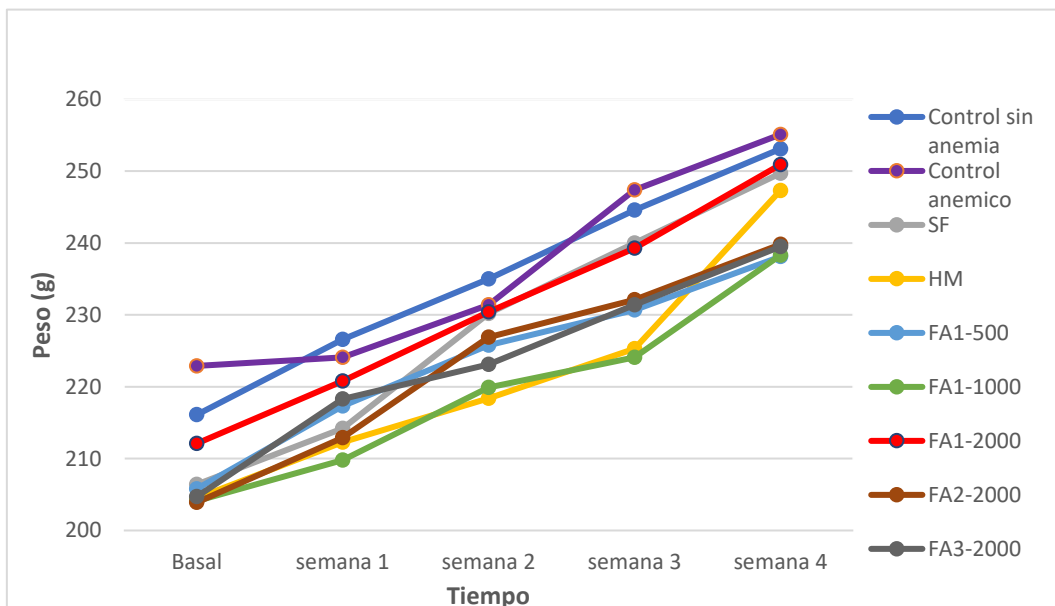
Al comparar el grupo SF versus los grupos de fórmulas alimenticias, desde el basal hasta la semana 3, evidenció diferencia significativa con todos los grupos de fórmulas alimenticias. Para la cuarta semana, el resultado fue similar con excepción del grupo FA1-2000. Por otro lado, al comparar el grupo HM versus los grupos de fórmulas alimenticias, desde el basal hasta la semana 2, presentó diferencia significativa con todos los grupos de fórmulas alimenticias. En la semana 3, el resultado fue similar con excepción del grupo FA1-1000 y finalmente para la semana 4, solo evidencio diferencia significativa con respecto al grupo FA1-2000.

Se puede en la figura 3 que al final del tratamiento, todos los grupos ganaron peso; sin embargo, al analizar la ganancia de peso final (tabla 8), se evidencia que el grupo SF obtuvo la mayor ganancia del peso al presentar un peso mayor y significativamente diferente en comparación a todos los grupos de fórmulas alimenticias ( $p > 0.05$ ) y los grupos controles. Por otro lado, al comparar solo los grupos de fórmulas alimenticias, el grupo FA1-2000, presentó una mayor ganancia de peso, siendo este valor similar al grupo control sin anemia ( $p > 0.05$ ).

**Figura 2. Actividad antianémica: Nivel de hemoglobina (g/dL) de ratas según tratamiento durante las 4 semanas de experimentación.**



**Figura 3. Actividad antianémica: Peso corporal (g) de ratas según tratamiento durante las 4 semanas de tratamiento.**



**Tabla 8. Actividad antianémica: Peso corporal (g) de ratas según tratamiento. Ratas anémicas<sup>b</sup>. Ratas sanas<sup>a</sup>**

	Grupos de tratamientos										p
	Grupo control sin anemia <sup>a</sup>	Grupo control anémico <sup>b</sup>	Fórmulas alimenticias								
			Grupo SF <sup>b</sup>	Grupo HM <sup>b</sup>	Grupo FA1-500 <sup>b</sup>	Grupo FA1-1000 <sup>b</sup>	Grupo FA1-2000 <sup>b</sup>	Grupo FA2-2000 <sup>b</sup>	Grupo FA3-2000 <sup>b</sup>		
<b>Basal<sup>Δ</sup></b>	216.1±2.5	222.9±9.3	206.4±6.3*●	204.5±5.2*●	205.8±5.9*●#	204.1±8.9*●#	212.1±4.5*●#	203.9±7.1*●#	204.7±4.8*●		0.000
<b>Semana1<sup>Ω</sup></b>	226.6±3.1	224.1±9.4	214.2±6.8*●	212.3±10*●	217.4±12.14*●#	209.8±9.1*●#	211.8±4.6*●#	212.9±8.25*●#	218.3±4.1*●#		0.000
<b>Semana2<sup>Ω</sup></b>	235±3.3	231.4±7.1	230.2±5.3*	213±8.6*●	225.82±11.3*#●	219.9±10.8*#●	222.3±5.17*#●	226.9±9.14*●	223.9±4*#●		0.000
<b>Semana3<sup>Δ</sup></b>	244.6±3.5	247.4±6.1	240±5.7●	225.3±9.5*#●	230.7±9.29*#●	224.1±11.7*#●	233.3±6.21*#●	232.1±10.3*#●	231.4±9.8*#●		0.021
<b>Semana4<sup>Δ</sup></b>	253.1±4.4	255.1±5.2	249.7±4.6	237.3±3.1*●	238.1±5.4#●*	238.3±14.9#●*	250.9±5.1#	239.8±12.5#●*	239.5±12.6#●*		0.01
<b>Ganancia de peso<sup>Δ</sup></b>	37.01±2.5	37.2±3.2	40.3±5.3*●	33.84±6.5*●	33.25±5.2*●#	34.12 ± 3*●#	38.81±2.6#	35.8±4*●#	34.7±8.45*●#		0.032

<sup>Δ</sup> Prueba de Kruskal Wallis por rangos;

<sup>Ω</sup> Prueba ANOVA;

\* p<0.05 Grupo control sin anemia vs grupos de tratamientos;

● p<0.05 Grupo control anémico vs grupos de tratamientos.

Con respecto al efecto de las tres fórmulas alimenticias sobre el nivel de hemoglobina (tabla 9); durante el basal, semana 1 y semana 2, el grupo control sin anemia presentó diferencia significativa del nivel de Hb con respecto al grupo control anémico y todos los grupos de tratamiento. Para la semana 3, se mantuvo esta diferencia significativa, con excepción del grupo SF, HM y FA1-2000; finalmente en la semana 4, presentó diferencia significativa con todos los grupos de tratamiento.

En la figura 2 se observa que, en la tercera semana, el grupo FA1-2000 fue el único de todos los grupos de fórmulas alimenticias en salir del cuadro de anemia ( $Hb > 12,3$  g/dL). En la semana 4, presentó un nivel de Hb superior al grupo control sin anemia ( $p < 0,05$ ) y a todos los grupos de fórmulas alimenticias. Asimismo, no evidencio diferencia significativa con respecto al grupo SF, quien es considerado el gold estándar.

Al comparar al grupo SF versus los grupos de fórmulas alimenticias, a partir de la semana 2, se evidencio diferencia significativa con todos los grupos de fórmulas alimenticias, con excepción del grupo FA1-2000. Por otro lado, al comparar el grupo HM versus los grupos de fórmulas alimenticias, a partir de la semana 3, se evidencio diferencia significativa con todos los grupos de fórmulas alimenticias con excepción del grupo FA1-2000.

En cuanto a la recuperación de los niveles de hemoglobina (semana 4 - basal), se observa una diferencia significativa del grupo control anémico con respecto a todos los grupos de tratamiento. Además, una diferencia significativa del grupo SF versus todos los grupos de tratamiento, con excepción del grupo HM y FA1-2000.



**Tabla 9. Actividad antianémica: Nivel de hemoglobina (g/dL) de ratas según tratamiento. Ratas anémicas<sup>b</sup>. Ratas sin**

	Grupos de tratamientos										p
	Grupo control sin anemia <sup>a</sup>	Grupo control anémico <sup>b</sup>	Fórmulas alimenticias								
			Grupo SF <sup>b</sup>	Grupo HM <sup>b</sup>	Grupo FA1-500 <sup>b</sup>	Grupo FA1-1000 <sup>b</sup>	Grupo FA1-2000 <sup>b</sup>	Grupo FA2-2000 <sup>b</sup>	Grupo FA3-2000 <sup>b</sup>		
<b>Basal</b> <sup>Q</sup>	13.7±0.41	8.13±0.26*	8.01±0.46*	8.66±0.28*	8.28±0.37*	7.93±0.51*	8.48±0.25*	7.76±0.16*	8.48±0.25*	7.96±0.37*	0.00
<b>Semana1</b> <sup>Q</sup>	13.7±0.28	8.48±0.23*	8.21±0.44*	8.83±0.26*	8.45±0.35*	8.11±0.47*	8.61±0.25*	8.03±0.16*	8.61±0.25*	8.25±0.31*	0.00
<b>Semana2</b> <sup>Q</sup>	13.75±0.43	8.6±0.23*	11.3±0.23*	10±0.14*	8.78±0.40*#	8.63±0.46*#	10±0.16*	8.16±0.24*#	10±0.16*	8.85±0.26*#	0.00
<b>Semana3</b> <sup>Δ</sup>	14±0.36	7.81±0.14*	13.9±0.15	13.4±0.12	9.41±0.10*#	10.5±0.09*#	12.66±0.08	11.78±0.07*#	12.66±0.08	10±0.08*#	0.00
<b>Semana4</b> <sup>Q</sup>	14.84±0.33	7.76±0.24*	16.28±0.2*	15.7±0.14*	12.3±0.19*#	13.2±0.19*#	15.98±0.14*	12.3±0.26*#	15.98±0.14*	12.96±0.2*#	0.00
<b>Diferencia de Hb<sup>Δ</sup></b>	1.14±0.21	-0.36±0.14	8.2±0.39*	7.1±0.28*	3.8±0.24*#	5.58±0.52*#	7.42±0.36*	4.6±0.35*#	7.42±0.36*	5±0.35*#	0.00

<sup>Δ</sup> Prueba de Kruskal Wallis por rangos;

<sup>Q</sup> Prueba ANOVA;

\* p<0.05 Grupo control sin anemia vs grupos de tratamientos;

● p<0.05 Grupo control anémico vs grupos de tratamientos.

## VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio estuvo dividido en dos partes. Primero se evaluó la toxicidad aguda de 3 fórmulas alimenticias (FA1, FA2 y FA3), que contienen quinua extruida, harina de arroz, suero de leche y hierro hemínico. Después de ello, se analizó el efecto de la administración de las mismas fórmulas, sobre la concentración de hemoglobina y peso corporal en ratas con anemia ferropénica inducida.

Con respecto a la evaluación de toxicidad aguda, durante los 14 días de seguimiento después de la administración de las 3 fórmulas alimenticias en la dosis de 2000 mg/kg, no se evidenció pérdida de peso significativo, conductas anormales ni signos clínicos de toxicidad en ambos ensayos. Así también, no hubo mortalidad en ninguno de los animales de experimentación. Por lo tanto, se puede señalar que, al administrar las 3 fórmulas alimenticias por vía oral, no presentaron efecto tóxico agudo en la dosis de 2000 mg/kg. Resultados similares se observaron en Meneguetti *et al.* (2011), donde evaluaron el potencial toxicológico de quinua hidrolizada (HQ) en ratas Wistar macho, y los resultados no mostraron toxicidad a nivel hepático ni renal, siendo la dosis administrada de 2000 mg/kg de HQ por 30 días (9). De igual manera, Estrada y Estrella (2020), reportaron ausencia de toxicidad aguda cuando evaluaron en ratas anémicas (cepa Holtzman) la harina de quinua, después de 7 días de observación con una dosis de 9000 mg/kg a 15000 mg/kg; sin embargo, en este caso sí se presentaron signos clínicos, tales como: piloerección, orina amarilla, heces de color negras, picazón cutánea e hiperventilación, pero no hubo mortalidad en ninguno de los grupos de experimentación en las dosis evaluadas (13).

Con respecto a la segunda parte del estudio, la inducción de anemia se llevó a cabo mediante la administración de una dieta libre de hierro por 30 días para luego evaluar el efecto de las 3 fórmulas alimenticias sobre el nivel de hemoglobina y peso corporal de las ratas anémicas durante 28 días. La dosis máxima utilizada fue de 2000 mg/kg, considerando que dicha dosis no presentó ningún efecto tóxico agudo.

Al inicio de la etapa experimental (basal), el peso promedio de todos los grupos de tratamiento, que eran ratas anémicas, fue menor y significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control sin anemia, que eran ratas sanas. Similar fue el resultado obtenido por Robles *et al.* (2020), donde evaluaron el efecto de dietas formuladas con dos tipos de leche (de cabra y de vaca) sobre la recuperación de anemia, en ella, se vio que al final del período pre-experimental (basal), el peso promedio del grupo anémico fue menor con respecto al grupo control sin anemia ( $p < 0,001$ ) (53). Esto podría deberse a que la anemia ferropénica tiene un impacto significativo a nivel óseo. El hierro participa en los procesos enzimáticos implicados en la síntesis de colágeno, el cual es un componente importante del tejido óseo, esto podría generar una disminución del desarrollo esquelético, y por ende, una disminución del peso corporal (54). Así mismo, una menor concentración de hemoglobina y, por consiguiente, de glóbulos rojos, origina que el suministro de oxígeno a las células sea menor, lo que limita la síntesis de ATP y el aumento del peso corporal (55).

En la última semana de tratamiento (semana 4), el grupo FA1-2000 obtuvo un peso similar al grupo control sin anemia (que eran ratas sanas) y al grupo SF (considerado gold estándar). Diferente fue el resultado obtenido por Anaya *et al.* (2020), donde evaluaron galletas con diferentes porcentajes de quinua y hierro hemínico bovino en ratas anémicas cepa Holtzman, y vieron que, al culminar el periodo del tratamiento, el peso promedio de las ratas alimentadas con la formulación 2 (mayor proporción de quinua y sangre bovina) fue mayor y significativamente diferente con respecto al grupo control negativo (ratas sanas) y grupo experimental que recibió la formulación 1 (menor proporción de quinua y sangre bovina) (12). Este resultado podría deberse a la presencia de la quinua del formulado 1. La quinua es un pseudocereal de alto valor biológico por presentar un buen aporte de proteínas tales como: albúmina (31 %) y globulina (37 %), además de presentar todos los aminoácidos considerados esenciales (13).

Al analizar la ganancia de peso final (semana 4 - basal), de todos los grupos control y de tratamiento, el grupo SF fue el que obtuvo una mayor ganancia. Diferente fue el resultado obtenido por Tello-Palma *et al.* (2022) donde evaluaron efectos de la suplementación de hierro micro encapsulado (hierro mineral) y hierro hemínico (hierro animal) en la

concentración de Hb y el peso corporal en ratas anémicas, sus resultados manifestaron una mejor recuperación del peso del grupo que recibió hierro hemínico (44,5 %) en comparación al grupo que recibió hierro microencapsulado (21,6 %) (10).

Al evaluar la actividad antianémica de las tres formulas alimenticias. La diferencia significativa del nivel de Hb entre el grupo control sin anemia versus el grupo control anémico y todos los grupos de tratamiento durante el basal ( $p < 0,00$ ), confirma que la anemia se instauró de manera experimental en el grupo control anémico y grupos de tratamiento utilizando la dieta libre de hierro.

Todos los grupos de fórmulas alimenticias lograron revertir el cuadro de anemia en la última semana; sin embargo, la formula alimenticia 1 (FA1) con dosis de 2000 mg/kg obtuvo una mejor respuesta antianémica, bajo el sustento de que fue el primer grupo en salir del cuadro de anemia ( $Hb > 12,3$  g/dL) en la tercera semana. Así mismo, al final del tratamiento no evidencio diferencia significativa con respecto al grupo SF (quien es considerado el gold estándar), y finalmente, supero al grupo control sin anemia, con una diferencia significativa, y presentó valores de Hb mayores que el grupo FA2 y FA3. Todo lo anteriormente mencionado, podría deberse a la presencia de la quinua (del formulado FA1) y sus propiedades antianemicas, los cuales han sido reportados anteriormente en diversos estudios.

Anaya *et al.* (2020), concluyeron que con niveles apropiados de quinua y hierro hemínico, se pudo revertir la anemia de una Hb promedio inicial de 11,4 g/dL a una final de 15,66 g/dL (12). Amaro-Terrazos *et al.* (2019), evaluaron el efecto antianémico del extracto acuoso de quinua en ratones anémicos, los resultados indicaron un incremento del nivel de Hb del grupo experimental de  $9,3 \pm 0,7$  g/dL a  $11,4 \pm 0,5$  g/dL, concluyendo finalmente que el extracto presentó un efecto antianémico, (15). Estrada y Estrella (2020), evaluaron el efecto de la harina de quinua y cañihua sobre el nivel de Hb en ratas anémicas, y observaron que en los animales tratados con la harina de quinua, incrementaron su nivel de Hb de  $9.7 \pm 0,4$  a  $17.9 \pm 0,3$  g/dL, y en caso de la harina de cañihua, de un  $9.8 \pm 0,2$  a  $17.2 \pm 0,2$  g/dL, mostrando una actividad antianémica (13). Esta mayor ganancia de Hb al final del tratamiento, a diferencia del presente estudio (16,28 g/dL), podría deberse a

que el tiempo de tratamiento fue mayor (12 semanas). Otra posible razón del porqué la FA1 obtuvo una mejor actividad antianémica, a pesar de que las tres fórmulas aportaron la misma cantidad de hierro (1.4 mg Fe/kg), podría deberse a que la histidina, lisina y metionina (aminoácidos presentes en la quinua del FA1) pueden formar complejos con el hierro en el tracto gastrointestinal, los cuales pueden mejorar la solubilidad y disponibilidad del hierro para la absorción en el intestino (61).

Por otro lado, desde la semana 3, el grupo HM presentó un nivel de Hb mayor y significativamente diferente con respecto a todos los grupos de fórmulas alimenticias con excepción del grupo FA1-2000, y teniendo presente que los tres formulados presentan los mismos ingredientes a excepción de la quinua, la harina de arroz y el suero de leche, se podría sospechar que algún componente del formulado FA2 y FA3, podría estar interfiriendo en la absorción del hierro hem. Este componente podría ser el calcio, que está presente en el suero de leche del formulado FA3 y en la harina de arroz del formulado FA2, en menor proporción. Hallberg *et al.* (1991), demostraron que la absorción del hierro hemínico disminuyó significativamente, cuando añadieron 165 mg de calcio (en forma de CaCl<sub>2</sub>) a una comida experimental, la cual contenía hierro hem (57). La quinua extruida del formulado FA1 también es una fuente de calcio (13); sin embargo, estudios evidencian su efecto antianémico mencionado anteriormente.

Los grupos: SF, HM y FA1-2000 obtuvieron la mejor recuperación de la anemia, medido por una mayor ganancia del nivel de Hb (semana 4 - basal). Sin embargo, a pesar de que el SF es un referente, gold estándar, contra el cual se mide la eficacia antianémica de otros compuestos, y es el más utilizado en el mundo frente a la anemia ferropénica por su eficacia y costo relativamente bajo (56), se debe de tener presente las contraindicaciones de su consumo. Se ha registrado que su suplementación puede producir malestares digestivos (náuseas, vómitos, constipación, diarrea, dolor abdominal) y esto puede limitar su eficacia (58), asimismo, posibles consecuencias a nivel renal y hepático. Lozano (2019), evaluó el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la anemia inducida en ratas y la capacidad antioxidante, siendo una de las conclusiones que el SF produjo una mayor alteración en la morfología celular, especialmente a nivel hepático (16). Guija *et al.* (2019), después de hacer un experimento en ratas, llegaron a la conclusión que hubo

un mayor daño hepático en las ratas tratadas con SF + vitamina C, que las ratas tratadas con hierro hemo (12). Por último, Abdel-Reheim, *et al.* (2017) desarrollaron un experimento en ratas donde llegaron a la conclusión que el uso de SF (6 mg Fe/Kg/día) llevó a la presencia de signos de hepatotoxicidad, evidenciado por daños en la membrana de las células hepáticas (11).

Finalmente, un punto importante a mencionar es que, para futuros estudios donde se evalúe la actividad antianémica de nuevas fórmulas o productos alimenticios, se podría incluir en el diseño experimental, un grupo de ratas con anemia inducida que solo reciban alimento convencional propia de la especie. De esta manera se podría evaluar el proceso de recuperación de las ratas anémicas sin ningún tratamiento. Esto podría ayudar a comprender hasta qué punto la suplementación con hierro (de diferentes fuentes) es necesaria, ya que en la actualidad se brinda suplementación de manera preventiva a niños menores de 5 años o embarazadas, sin una previa evaluación de la necesidad de hierro.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. No se evidenció toxicidad aguda en las 3 fórmulas alimenticias (FA1, FA2 y FA3), bajo las condiciones de experimentación señaladas a una dosis de 2000 mg/kg.
2. Las 3 fórmulas alimenticias presentaron un efecto antianémico sobre las ratas con anemia inducida, sustentado por la recuperación de los niveles de Hb hasta valores fisiológicamente normales.
3. De las 3 fórmulas alimenticias, la fórmula alimenticia 1 (FA1) en la dosis de 2000 mg/kg, obtuvo la mayor ganancia de peso en las ratas con anemia inducida.
4. De las 3 fórmulas alimenticias, la fórmula alimenticia 1 (FA1), obtuvo la mejor respuesta antianémica en la dosis de 2000 mg/kg.

## **X. LIMITACIONES**

1. El estudio no determina la toxicidad a nivel macroscópico o histológico de órganos internos.
2. La guía n°423 regulada bajo la normativa de la OECD, utilizada para la evaluación de toxicidad aguda, solamente estima la dosis letal media (LD50) de manera aproximada, mas no la calcula de manera exacta.
3. El método “depleción- repleción de la hemoglobina” solamente se llevó a cabo en ratas macho.

## **XI. FORTALEZAS**

1. El estudio reveló la inocuidad (un rango de dosis determinada) y la capacidad de revertir la anemia, de 3 formulas alimenticias de alto valor biológico y nutricional. Lo cual las hace una posible alternativa a la suplementación con sales ferrosas.
2. El estudio permite revalorar el consumo de quinua (alimento ancestral).
3. El estudio permite que se desarrollen futuras investigaciones, donde se continúen evaluando los beneficios y las contraindicaciones de la suplementación con hierro.
4. El estudio ofreció una referencia de que el método “depleción- repleción de la hemoglobina” se puede llevar a cabo sólo con la administración de una dieta libre de hierro, sin la necesidad de realizar ningún tipo de desangrado en las ratas. Se evita de esta manera daños o molestias al animal.

## **XII. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar la posibilidad de efectos colaterales, determinando la toxicidad crónica de las 3 fórmulas alimenticias que incluya un análisis macroscópico e histopatológico de órganos internos (hígado, pulmón, corazón, riñón, estómago, etc.).
2. Realizar un análisis bromatológico y prueba de digestibilidad de las 3 fórmulas alimenticias.
3. Medir el nivel de agrado (hedónico) de las 3 fórmulas alimenticias, mediante una prueba de aceptabilidad.
4. Incluir en el diseño experimental, de futuras investigaciones donde se evalúe la actividad antianémica de fórmulas o productos alimenticios, un grupo de ratas con anemia ferropénica inducida que solo reciban alimento convencional. Así mismo, un grupo de ratas sanas que reciban suplementación con hierro (hemínico y no hemínico).
5. La suplementación con hierro solo se debería de realizar, si se comprueba que hay una deficiencia de hierro en el organismo y teniendo un diagnóstico exacto de su origen.

## **XII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA**

1. UNICEF. La primera infancia importa para cada niño [Internet]. New York. 2017. Disponible en: [https://www.unicef.org/peru/sites/unicef.org/peru/files/2019-01/La\\_primera\\_infancia\\_importa\\_para\\_cada\\_nino\\_UNICEF.pdf](https://www.unicef.org/peru/sites/unicef.org/peru/files/2019-01/La_primera_infancia_importa_para_cada_nino_UNICEF.pdf)
2. MIDIS. Plan multisectorial de lucha contra la anemia [Internet]. octubre 2018. [cited 2020 Jun 8]. Disponible en: <http://www.midis.gob.pe/dmdocuments/plan-multisectorial-de-lucha-contr-la-anemia-v3.pdf>
3. INEI. Perú: Encuesta Demográfica y de Salud Familiar 2021 - Nacional y Departamental [Internet]. 2021 [cited 2022 Aug 29]. Disponible en:



- [https://proyectos.inei.gob.pe/endes/2021/INFORME\\_PRINCIPAL/INFORME\\_PRINCIPAL\\_ENDES\\_2021.pdf](https://proyectos.inei.gob.pe/endes/2021/INFORME_PRINCIPAL/INFORME_PRINCIPAL_ENDES_2021.pdf)
4. Donato H, Rapetti MC, Morán L, Cavo M. Hidróxido férrico polimaltosado contra sulfato ferroso en el tratamiento de la anemia ferropénica: estudio prospectivo aleatorizado. Arch argent pediatr [Internet]. 2007 [cited 2022 Dec 13];491–7. Disponible en: <http://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2007/v105n6a04.pdf>
  5. Nieva Villegas LM. Representaciones sociales de los multimicronutrientes chispitas en madres de niños suplementados en un establecimiento de salud de Huancayo [Internet]. Universidad Nacional del Centro de Perú; 2017. Disponible en: [https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/5231/Nieva\\_Villegas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/5231/Nieva_Villegas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  6. Schauer C, Zlotkin S. Home fortification with micronutrient sprinkles - A new approach for the prevention and treatment of nutritional anemias. Paediatr Child Health (Oxford). 2003;8(2):87–90.
  7. Guillén Quijano GBC. Adherencia y factores asociados a la suplementación de hierro en gestantes anémicas en el Hospital Santa Rosa, Pueblo Libre [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 9]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3615>
  8. Merino Almaraz VN, Lozano Beltrán DF, Torrico F. Factores que influyen en la adherencia a la suplementación con sulfato ferroso durante el embarazo. Gac méd Boliv. 2010;33(2):21–5.
  9. Menegueti Q, Brenzan M, Batista M, Rodrigues D, Barbosa R, Garcia D. Biological Effects of Hydrolyzed Quinoa Extract from Seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. J Med food. 2011;14(6):653–7.
  10. Campos Á-, García-hernández Y, González-hernández R, García-pérez Á, Sergio C. Efecto de la suplementación con diferentes fuentes de hierro durante la recuperación de ratas anémicas. Rev CENIC Ciencias Biológicas. 2013;44(3):14–22.
  11. Abdel-Reheim MA, Messiha Shehata BA, Abo-Saif AA. Hepatoprotective Effect of Diosmin on Iron-induced Liver Damage. Int J Pharmacol [Internet]. 2017;13(6):529–40. Disponible en:

- <https://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ijp/2017/529-540.pdf>
12. Guija E, Troncoso L, Palomino F, Guija H, Oliveira G, Ponce J, et al. Estudio histopatológico de los efectos de la administración de hierro hemo y sulfato ferroso con vitamina C en cerebro e hígado de rata. *Horiz Médico* [Internet]. 2019 Jun 8 [cited 2022 Dec 6];19(2):12–8. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-558X2019000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2019000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
  13. Estrella Tolentino JS, Estrada Huatuco ZS. Evaluación de la actividad antianémica de la harina de quinua (*chenopodium quinoa willd*) variedad negra collana y cañihua (*chenopodium pallidicaule aellen*) variedad ramis en ratas anémicas cepa Holtzman, Lima-2020. [Internet]. Repositorio institucional-WIENER. [Lima]: Universidad Privada Norbert Wiener; 2020 [cited 2022 Dec 15]. Disponible en: <https://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/20.500.13053/6724>
  14. Anaya González RB, De La Cruz Fernández E, Cóndor Alarcón R, Espitia Rangel E, Navarro Torres R, Rivera Villar J. Evaluación De Formulaciones De Galletas Antianémicas Con Diferentes Contenidos De Quinoa Y Diferentes Contenidos En Hierro Hemínico, Por Reducción De Anemia En Ratas Holtzman. *Rev Boliv Química*. 2020;37(2):74–84.
  15. Amaro terrazos J, Iparraguirre M, Jiménez Soria A. Efecto del consumo del extracto de quinua en anemia ferropénica inducida en ratones. *Rev Salud Pública*. 2019;21(2):232–5.
  16. Lozano Villafuerte L. Efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la capacidad antioxidante y la anemia inducida en ratas [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11432>
  17. Mahan LK, Raymond JL. *Krause Dietoterapia*. 14th ed. Barcelona: Elsevier; 2017.
  18. INEI. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar ENDES 2021 Nacional y Departamental [Internet]. 2022. Disponible en: [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1838/](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1838/)
  19. F P, M A, M O. Hierro. In: Gil Hernandez Á, editor. *Tratado de nutrición, Nutrición y enfermedad*. 3rd ed. Madrid: Editorial médica panamericana, S. A.;

2017. p. 509–26.
20. Comité Nacional de Hematología O y MT y, De NCN. Deficiencia de hierro y anemia ferropénica. Guía para su prevención, diagnóstico y tratamiento. Soc Argentina Pediatría. 2017;115(4):s68–82.
  21. INEI. Perú: Encuesta demográfica y de Salud Familiar (ENDES) - 2017 [Internet]. 2018. [cited 2020 Jun 7]. Disponible en: [https://www.inei.gov.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1525/index.html](https://www.inei.gov.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1525/index.html)
  22. R. De la Prieta, J.J. Alonso, A. Cánovas, S. Madrazo, Y. Ugalde CA. Anemias Ferropénicas (II). Gac Med Bilbao [Internet]. 2022;99(2):41–3. Disponible en: <file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/S0304485802743941.pdf>
  23. Organización Mundial de la Salud. Anemia [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: [https://www.who.int/es/health-topics/anaemia#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/anaemia#tab=tab_1)
  24. Ministerio de Salud del Peru. Plan Nacional para la Reduccion y Control de la Anemia Materno Infantil y la Desnutrición Crónica Infantil en el Peru : 2017-2021 [Internet]. 2021 [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/280855-plan-nacional-para-la-reduccion-y-control-de-la-anemia-materno-infantil-y-la-desnutricion-cronica-infantil-en-el-peru-2017-2021-documento-tecnico>
  25. Instituto Nacional de Salud. Recomiendan incrementar el consumo de alimentos ricos en hierro para prevenir anemia infantil en tiempos de pandemia | INSTITUTO NACIONAL DE SALUD [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: <https://web.ins.gob.pe/es/prensa/noticia/recomiendan-incrementar-el-consumo-de-alimentos-ricos-en-hierro-para-prevenir-anemia>
  26. Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri). Para combatir la anemia, MINAGRI promueve un mayor consumo de granos andinos - Noticias - Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - Gobierno del Perú [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/11949-para-combatir-la-anemia-minagri-promueve-un-mayor-consumo-de-granos-andinos>
  27. Ministerio de Economía y Finanzas. Meta 4: Acciones de municipios para promover la adecuada alimentación, la prevención y reducción de la Anemia [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Disponible en:

- [https://www.mef.gob.pe/contenidos/presu\\_publ/migl/metas/guia\\_meta4\\_2022.pdf](https://www.mef.gob.pe/contenidos/presu_publ/migl/metas/guia_meta4_2022.pdf)
28. Alcázar L. Impacto Económico de la Anemia en el Perú. [cited 2022 Dec 6]; Disponible en: [http://www.grade.org.pe/upload/publicaciones/archivo/download/pubs/LIBROGRADERADE\\_ANEMIA.pdf](http://www.grade.org.pe/upload/publicaciones/archivo/download/pubs/LIBROGRADERADE_ANEMIA.pdf)
  29. Cabrera Feijoo A. El impacto de la anemia en el crecimiento económico por departamento del Perú (2009-2017) [Internet]. [Lima]: Universidad de Lima; 2021 [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: [https://repositorio.ulima.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12724/14793/Aura\\_Celia\\_Cabrera\\_Feijoo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ulima.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12724/14793/Aura_Celia_Cabrera_Feijoo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  30. Vásquez-Velásquez C, Gonzales GF. La prevalencia de anemia infantil no aumentó durante la pandemia de COVID-19. Diagnóstico [Internet]. 2021 Dec 30 [cited 2022 Dec 6];60(4):252–5. Disponible en: <http://142.44.242.51/index.php/diagnostico/article/view/327>
  31. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Informe Preliminar Perú: Indicadores de Resultados de los Programas Presupuestales (Primer Semestre 2022) [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: [https://proyectos.inei.gob.pe/endes/2022/ppr/Indicadores\\_de\\_Programas\\_Presupuestales\\_I\\_Semestre\\_2022.pdf](https://proyectos.inei.gob.pe/endes/2022/ppr/Indicadores_de_Programas_Presupuestales_I_Semestre_2022.pdf)
  32. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia Del Sistema De Información Del Estado Nutricional en EESS | INSTITUTO NACIONAL DE SALUD [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: <https://web.ins.gob.pe/es/alimentacion-y-nutricion/vigilancia-alimentaria-y-nutricional/vigilancia-del-sistema-de-informacion-del-estado-nutricional-en-EESS>
  33. Instituto Nacional de Salud. “Anemia no es lo mismo que deficiencia de hierro” [Internet]. INS. [cited 2022 Dec 6]. Disponible en: <https://web.ins.gob.pe/es/prensa/noticia/anemia-no-es-lo-mismo-que-deficiencia-de-hierro>
  34. Gonzales GF, Olavegoya P, Cayetano Heredia P. Fisiopatología de la anemia durante el embarazo: ¿anemia o hemodilución? Rev Peru Ginecol y Obstet [Internet]. 2019 Oct 2 [cited 2022 Dec 6];65(4):489–502. Disponible en:

- [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2304-51322019000400013&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322019000400013&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
35. Gonzales GF, Olavegoya P, Vásquez-Velásquez C, Alarcón-Yaquette DE. Uso de hemoglobina (Hb) para definir anemia por deficiencia de hierro. *Rev Peru Investig Matern Perinat* [Internet]. 2018 Feb 13 [cited 2022 Dec 6];7(1):37–54. Disponible en:  
<https://investigacionmaternoperinatal.inmp.gob.pe/index.php/rpinmp/article/view/108>
  36. Gonzales GF. Diferencias en la detección de anemia en la altura según la Organización Mundial de la salud - Réplica de autores. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2012 [cited 2022 Dec 6];29(1):158–9. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342012000100029&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342012000100029&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
  37. Gonzales E, Huamán-Espino L, Gutiérrez C, Aparco JP, Pillaca J. Characterization of anemia in children under five years of age from urban areas of Huancavelica and Ucayali, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015;32(3):431–9.
  38. Pita Martín de Portela M. Aspectos nutricionales de vitaminas y minerales en el siglo XXI. 1st ed. octubre 2015. Buenos Aires: Asociación Argentina de tecnólogos Alimentarios-AATA; 2015. 242–259 p.
  39. Gaitán C. D, Olivares G. M, Arredondo O. M, Pizarro A. F. BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO EN HUMANOS. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2006 [cited 2022 Dec 12];33(2):142–8. Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182006000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182006000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
  40. Puga AM, Samaniego-vaesken M de L, Montero-bravo A, Ruperto M, Partearroyo T, Varela-moreiras G. Iron Supplementation at the Crossroads of Nutrition and Gut Microbiota: The State of the Art. *Nutr* [Internet]. 2022 May 4 [cited 2022 Dec 6];14(9):1926. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/9/1926/htm>
  41. Botta A, Barra NG, Lam NH, Chow S, Pantopoulos K, Schertzer JD, et al. Iron Reshapes the Gut Microbiome and Host Metabolism. *J Lipid Atheroscler* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Dec 6];10(2):160–83. Disponible en: <https://doi.org/10.12997/jla.2021.10.2.160>

42. Phipps O, Al-Hassi HO, Quraishi MN, Kumar A, Brookes MJ. Influence of Iron on the Gut Microbiota in Colorectal Cancer. *Nutr* 2020, Vol 12, Page 2512 [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2022 Dec 6];12(9):2512. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2512/htm>
43. Bloor SR, Schutte R, Hobson AR. Oral Iron Supplementation—Gastrointestinal Side Effects and the Impact on the Gut Microbiota. *Microbiol Res* [Internet]. 2021 Jun 12 [cited 2022 Dec 6];12(2):491–502. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2036-7481/12/2/33/htm>
44. Malesza IJ, Bartkowiak-Wieczorek J, Winkler-Galicki J, Nowicka A, Dzięciołowska D, Błaszczuk M, et al. The Dark Side of Iron: The Relationship between Iron, Inflammation and Gut Microbiota in Selected Diseases Associated with Iron Deficiency Anaemia—A Narrative Review. *Nutr* [Internet]. 2022 Aug 24 [cited 2022 Dec 6];14(17):3478. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/17/3478/htm>
45. Valverde-Bruffau VJ, Steenland K, Gonzales GF. Association between iron supplementation and the presence of diarrhoea in Peruvian children aged 6–59 months: analysis of the database of the Demographic and Family Health Survey in Peru (DHS, Peru), years 2009–2019. *Public Health Nutr* [Internet]. 2022 Oct 10 [cited 2022 Dec 6];25(10):2855–63. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/public-health-nutrition/article/association-between-iron-supplementation-and-the-presence-of-diarrhoea-in-peruvian-children-aged-6-59-months-analysis-of-the-database-of-the-demographic-and-family-health-survey-in-peru-dhs-peru-years-20092019/E3098CCC7A0D83510BB4A80A101E6DEE>
46. Caballero P, Valdivia J. Efecto del consumo de galletas elaboradas con harina de trigo, camu camu y sangrecita, sobre el nivel de hemoglobina en unidades experimentales con anemia inducida, Arequipa 2018 [Internet]. [cited 2020 Jun 7]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/7678>
47. Revista Agronoticias. Elaboran gomitas de aguaymanto y sangre de cuy para combatir la anemia [Internet]. 29 de marzo del 2019. [cited 2020 Jun 7]. Disponible en: <https://agronoticias.pe/alimentacion-y-salud/elaboran-gomitas-de-aguaymanto-y-sangre-de-cuy-para-combatir-la-anemia/>

48. RPP. Joven ingeniero desarrolló como tesis galletas ricas en hierro que combaten la anemia | RPP Noticias [Internet]. [cited 2020 Jun 7]. Disponible en: <https://rpp.pe/peru/ayacucho/joven-ingeniero-creo-galletas-ricas-en-hierro-que-combaten-la-anemia-noticia-1182828>
49. Belizario N, Monteagudo M. Efecto del extracto acuoso de la semilla de salvia hispánica l (chía) sobre la vasodilatación de anillos aórticos en *Rattus norvegicus* var. Sprague Dawley con anemia ferropénica inducida Arequipa-2015 [Internet]. 2015 [cited 2020 Jun 8]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/1853>
50. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method n°423. *Oecd Guidel Test Chem*. 2001;1–14.
51. García Hernández Y, Carmona Castro A, Cárdenas Vázquez R, González hernández R. Desarrollo de un biomodelo de ratas anémicas mediante dos tipos de dietas de caseína. *Rev Cub Aliment Nutr*. 2010;20(1):26–34.
52. Cromatest. Colorimetría para determinación de hierro en sangre. 2015;693–4. Disponible en: [http://www.linear.es/ficheros/archivos/46\\_1134015C.pdf](http://www.linear.es/ficheros/archivos/46_1134015C.pdf)
53. Robles Rebollo M, López-Aliaga I, Díaz-Castro J, Moreno-Fernández, J Muñoz Alférez M. Estatus férrico, cambios ponderales y composición corporal durante la recuperación de la anemia en un modelo experimental: efecto de la leche fermentada de cabra o vaca. *Nutr Hosp*. 2020;37(3):568–76.
54. Díaz-Castro J, López-Frías MR, Campos MS, López-Frías M, Alférez MJM, Nestares T, et al. Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats. *Eur J Nutr* [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 May 2];51(2):241–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21647667/>
55. Mcaninch EA, Bianco AC. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2014 [cited 2022 May 2];1311(1):77–87. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24697152/>
56. Donato H, Rosso A, Buys C, Rossi N, Rapetti C, Matus M. Anemia ferropénica. Normas de diagnóstico y tratamiento Comités de la SAP. *Arch.argent.pediatr*. 2001;99(2):162–7.
57. Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hultén L. Calcium:

- effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1991 Jan 1 [cited 2023 Jan 9];53(1):112–9. Disponible en: <https://academic.oup.com/ajcn/article/53/1/112/4691191>
58. Donato H, Rapetti C, Moran L, Cavo M. Comparación entre hierro polimaltosa y sulfato ferroso para el tratamiento de la anemia ferropénica: estudio prospectivo aleatorizado. *Arch Argent Pediatr*. 2007;105(6):491–7.
59. Acosta a, S C. Evaluación de la absorción de hierro contenido en la *Spiriluna platensis* por el metodo de absorción atómica en la recuperación de ratas con anemia ferropenica. tesis pregrado. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín, Escuela de Ciencias de la Nutrición; 2004.
60. Quispe, A. Efecto del consumo de gomitas funcionales en base a quinua, hígado de pollo y plátano en la recuperación de ratas con anemia inducida [Tesis]. : Universidad Nacional del Altiplano; 2021. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/16945>
61. Ruiz M, Picó M, Rosich L, Morales L. El factor alimentario en la presencia de la deficiencia del hierro. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2002;18(1):46-52
62. Arias Gonzáles, J. L. Guía para elaborar la operacionalización de variables. *Espacio I+D: Innovación más Desarrollo*. 2021; 10(28): 43-56. Disponible en: <https://espacioimasd.unach.mx/index.php/Inicio/article/download/274/973/1683>

### **XIII. ANEXOS**

#### **ANEXO 1**

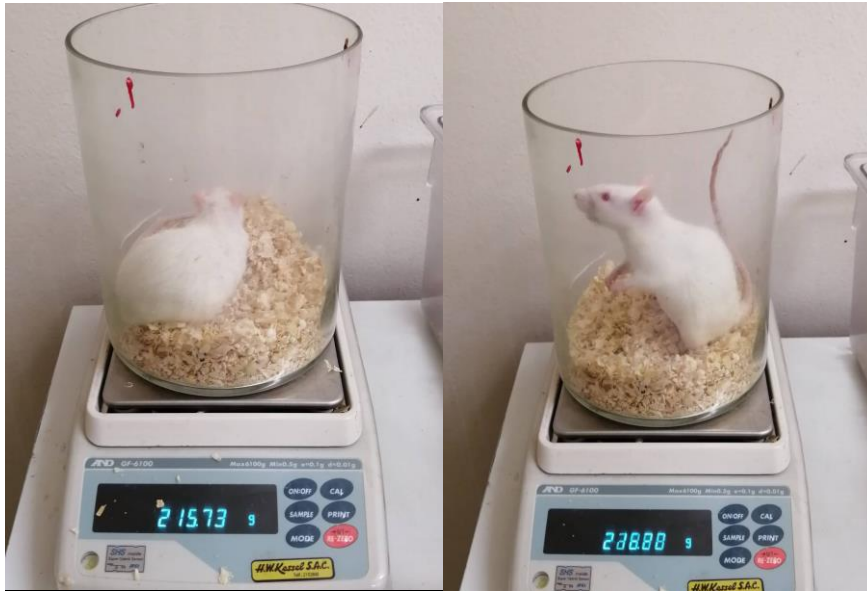
**Figura 4. Dosaje de hemoglobina: Extracción de sangre del seno retro - orbital en ratas.**





## ANEXO 2: Evidencias fotográficas

**Figura 5. Pesado de los animales de experimentación (ratas cepa holtzman) en balanza analítica**



**Figura 6. Periodo de adaptación de las ratas de experimentación**



## ANEXO 3: Constancia de aprobación del comité de ética



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de  
INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)

### CONSTANCIA 039 - 12 - 20

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue APROBADO por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Evaluación tóxica aguda y efecto sobre los niveles de hemoglobina en ratas inducidas a anemia ferropénica de tres fórmulas alimenticias conteniendo harina de arroz, quinua germinada, suero de leche y hierro hemínico".

Código de inscripción : 201960

Investigadores : Cáceres Palma, Georgina Lourdes

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, recibido en fecha 14 de octubre del 2020.

La APROBACIÓN considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el 13 octubre del 2021.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 14 de octubre del 2020.

Dr. Manuel Gasco Tantachuco  
Presidente

Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

/s/

## ANEXO 4

**Tabla 4. Requerimiento nutricional diario en ratas**

Nutriente	Requerimiento diario	Cantidad
Proteína cruda	1.8	g
Grasa	0.5	g
Energía	40	Kcal
Calcio	60	mg
Hierro	0.25	mg
Fosforo	50	mg
Sodio	50	mg
Potasio	18.0	mg

Fuente: Quispe A, 2021 (60)

## ANEXO 5

**Tabla 3. Valores de referencia del nivel de hemoglobina en ratas según rango de edad**

Parámetros	Género					
	Hembras			Machos		
	Rangos de edades (semanas)					
	5 - 8	9 - 14	15 - 22	5 - 8	9 - 14	15 - 22
<b>Nivel de hemoglobina (g/dL)</b>	11.8 - 15.4	11.2 - 14.8	11.9 - 15.1	12.3 - 15.1	12.0 - 15.1	12.6 - 15.5

Fuente: Belizario y Monteagudo, 2015 (49)

## ANEXO 6

**Tabla 7. Toxicidad aguda: Ficha de registro de signos clínicos de toxicidad**

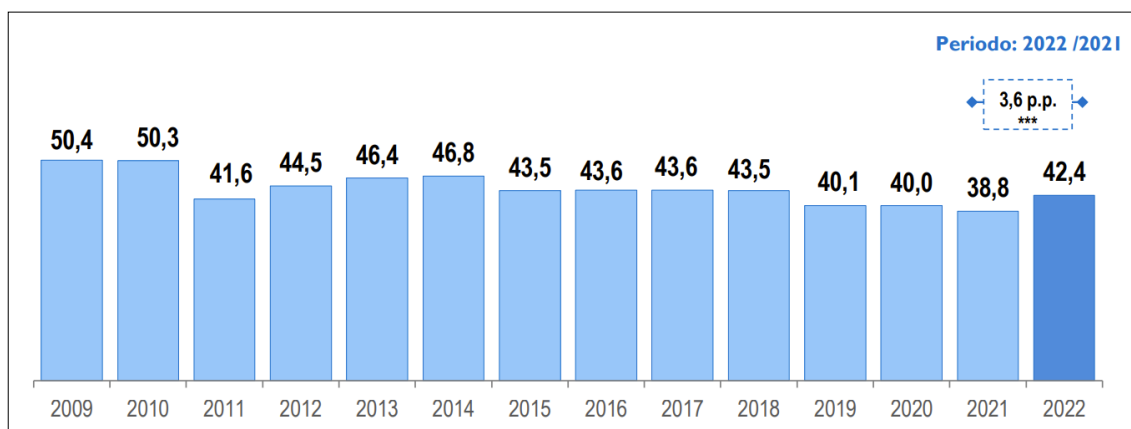
Parámetros	Hora			Días													
	1h	2h	4h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Grupos de tratamiento</b>																	
Mu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Control</b>																	
Mu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- |     |                                 |                          |
|-----|---------------------------------|--------------------------|
| 0:  | No presenta patología           | +: Presenta patología    |
| Mu: | Muerte                          | U: Urogenital            |
| C:  | Comportamiento                  | P: Piel                  |
| R:  | Respiratorio                    | M: Muscular              |
| D:  | Digestivo                       | CS: Compromiso Sistémico |
| CD: | Cardiovascular y Hematopoyética |                          |

Fuente: elaboración propia

## ANEXO 7

**Figura 7. Niñas y niños de 6 a 35 meses de edad con anemia, 2009- 2022**



Diferencia significativa ( $p < 0.10$ ); \*\* Diferencia altamente significativa ( $p < 0.05$ );

\*\*\* Diferencia muy altamente significativa ( $p < 0.01$ ).

Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática – Encuesta Demográfica y de Salud Familiar