



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Comparación de la bioaccesibilidad de calcio en leche
de vaca y muestras de alimentos líquidos de ajonjolí
(*Sesamun indicum*) y almendra (*Prunus amygdalus*)**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Fisiología

AUTOR

Narda Lucía DAMIÁN BASTIDAS

ASESOR

Elydia Cornelia MÚJICA ALBAN

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Damián N. Comparación de la bioaccesibilidad de calcio en leche de vaca y muestras de alimentos líquidos de ajonjolí (*Sesamun indicum*) y almendra (*Prunus amygdalus*) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Narda Lucía Damián Bastidas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47137753
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-0409-6244
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Elydia Cornelia Mujica Alban
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07769567
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8331-9935
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	José Manuel Ortiz Sánchez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07615307
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	José del Carmen Aliaga Arauco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07574720
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Jesús Alberto Díaz Franco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08454600
Datos de investigación	

Línea de investigación	
Grupo de investigación	
Agencia de financiamiento	Ninguna
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires País: Argentina Departamento: Ciudad Autónoma de Buenos Aires Provincia: Buenos Aires Distrito: Recoleta Calle: Junín N°954 Latitud: -34.597861° Longitud: -58.397667°
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019-2020
URL de disciplinas OCDE	Fisiología: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.08 Nutrición, Dietética: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.04



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Vicedecanato de Investigación y Postgrado

Sección Maestría



ACTA DE GRADO DE MAGISTER

En la ciudad de Lima, a los 21 días del mes de diciembre del año dos mil veintiuno siendo las 4:00 pm, bajo la presidencia del Dr. José Manuel Ortiz Sánchez, con la asistencia de los Profesores: Dr. José del Carmen Aliaga Arauco (Miembro), Mg. Jesús Alberto Díaz Franco (Miembro), y la Dra. Elydia Cornelia Mujica Alban (Asesora); la postulante al Grado de Magíster en Fisiología, Bachiller en Nutrición, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **“Comparación de la bioaccesibilidad de calcio en leche de vaca y muestras de alimentos líquidos de ajonjolí (*Sesamun indicum*) y almendra (*Prunus amygdalus*)”**, con el fin de optar el Grado Académico de Magíster en Fisiología. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **A EXCELENTE 19**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **Magíster en Fisiología** a la postulante **Narda Lucía Damián Bastidas**.

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo la 5:31 pm. se da por concluido el acto académico de sustentación.

Dr. José del Carmen Aliaga Arauco
Profesor Invitado
Miembro

Mg. Jesús Alberto Díaz Franco
Profesor Asociado
Miembro



Dra. Elydia Cornelia Mujica Alban
Profesor Principal
Asesora

Dr. José Manuel Ortiz Sánchez
Profesor Principal
Presidente

DEDICATORIA

El presente está dedicado a:

Mis padres, Carito y Víctor, por su apoyo incondicional en este largo camino, por ser parte importante de mi vida y alentar cada una de mis metas.

A mi esposo Joel por acompañarme en todo el proceso de investigación, por sus palabras de aliento, por la fortaleza que me brinda cada día y por motivarme a ser mejor cada día

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la doctora Elydia Mujica por su asesoría y acompañamiento en el proceso de investigación y también a la doctora Julieta Binaghi por su apoyo en la parte experimental de la investigación.

ÍNDICE GENERAL**CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN****I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

1.1 Situación Problemática	8
1.2 Formulación del problema	11
1.3 Justificación	11
1.4 Objetivos de la Investigación	11

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del Problema	13
2.2 Bases teóricas	15

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y Diseño de Investigación	25
3.2 Unidad de Análisis	25
3.3 Población de Estudio	25
3.4 Selección de la Muestra	27
3.5 Técnicas de recolección de datos	27

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados	30
--	----

CAPÍTULO V: DISCUSIONES 36**CONCLUSIONES** 44**RECOMENDACIONES** 44**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 45**ANEXOS** 52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de calcio en diferentes derivados lácteos	21
Tabla 2. Consumo promedio per cápita anual de productos lácteos por ámbito geográfico, según principales productos lácteos	22
Tabla 3. Composición nutricional de la semilla de ajonjolí en 100 g	22
Tabla 4. Composición nutricional de la semilla de almendra en 100 g	24
Tabla 5. Valores de calcio y porcentaje de calcio dializado de acuerdo al tipo de muestra estudiada	31
Tabla 6. Requerimiento diario de calcio en diferentes grupos etarios	33
Tabla 7. Contenido de calcio en 100 ml de muestra y porcentaje de cobertura del requerimiento diario en los diferentes grupos etarios	33
Tabla 8. Aporte potencial promedio de calcio y porcentaje de cobertura del requerimiento diario en niños de 1 a 6 años	35
Tabla 9. Aporte potencial promedio de calcio y porcentaje de cobertura del requerimiento diario en adolescentes y adultos	35

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura1. Cantidad promedio de calcio
potencialmente absorbible por cada 100 ml
de las tres muestras investigadas

34

RESUMEN CON PALABRAS CLAVE

Introducción: La biodisponibilidad de un nutriente es la integración de procesos fisiológicos mediante los cuales un nutriente se encuentra disponible para ser absorbido y utilizado, su conocimiento es necesario para determinar la calidad nutricional de un alimento.

Objetivo: Comparar la bioaccesibilidad de calcio entre las muestras de alimentos líquidos de ajonjolí (*Sesamun indicum*), almendra (*Prunus amygdalus*) con la bioaccesibilidad de calcio de la leche de vaca utilizando un método in vitro.

Materiales y métodos: Estudio de tipo observacional donde se evaluó la bioaccesibilidad de la leche de vaca y muestras líquidas de ajonjolí y almendra mediante un método in vitro denominado dializabilidad, el cual consiste en un proceso de digestión enzimática y absorción en condiciones semejantes a las fisiológicas. Las variables numéricas fueron resumidas mediante promedio y desviación estándar.

Resultados: En una muestra de 100 ml el contenido de calcio fue de 102.94 mg, 24.52 mg y 6.52 mg para la leche de vaca, la muestra líquida de almendras y la muestra de ajonjolí, respectivamente. El porcentaje de dializabilidad para la leche de vaca fue de 20.71%, para la muestra líquida de almendras fue de 8.71% y para la muestra líquida de ajonjolí fue de 6.84%. El aporte potencial de calcio en 100 ml de leche fresca fue de 20.5 mg de calcio, en la muestra líquida de almendras fue de 2.15 mg y en la muestra líquida de ajonjolí fue de 0.43 mg.

Conclusiones: El contenido de calcio, bioaccesibilidad y aporte potencial de calcio de la leche fresca de vaca fue superior en comparación con las muestras líquidas de almendras y ajonjolí.

Palabras clave: Disponibilidad biológica, calcio, calcio en la dieta, prunus dulcis, sesamum.

ABSTRACT

Introduction: The bioavailability of a nutrient is the integration of physiological processes through which a nutrient is available to be absorbed and used, its knowledge is necessary to determine the nutritional quality of a food.

Objective: To compare the calcium bioaccessibility between sesame (*Sesamun indicum*), almond (*Prunus amygdalus*) liquid food samples with the calcium bioaccessibility of cow's milk using an in vitro method.

Materials and methods: An observational study where the bioaccessibility of cow's milk and sesame and almond liquid samples was evaluated through an in vitro method called dialyzability, which consists of a process of enzymatic digestion and absorption under conditions similar to physiological ones. The numerical variables were summarized by mean and standard deviation.

Results: In a 100 ml sample, the calcium content was 102.94 mg, 24.52 mg and 6.52 mg for cow's milk, the liquid sample of almonds and the sample of sesame, respectively. The percentage of dialysability for cow's milk was 20.71%, for the liquid sample of almonds it was 8.71% and for the liquid sample of sesame it was 6.84%. The potential contribution of calcium in 100 ml of fresh milk was 20.5 mg of calcium, in the liquid sample of almonds it was 2.15 mg and in the liquid sample of sesame it was 0.43 mg.

Conclusions: The calcium content, bioaccessibility and potential calcium contribution of fresh cow's milk was higher compared to the liquid samples of almonds and sesame.

Key words: Biological availability, calcium, calcium in the diet, prunus dulcis, sesamum.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

I. Planteamiento del Problema

1.1 Situación Problemática

La biodisponibilidad de un nutriente, también conocida como bioasimilación o disponibilidad biológica, se basa en la integración de distintos procesos fisiológicos, de bioactividad y bioaccesibilidad, mediante los cuales una fracción de un nutriente ingerido se encuentra disponible para la digestión, absorción, transporte, utilización y eliminación (Haro-Vicente y Martínez-Graciá, 2006) (Klobukowski, Skibniewska y Kowalski, 2014). En ese sentido, el contenido total de un nutriente determinado, en especial de minerales como hierro, zinc, calcio y magnesio, en un alimento no es el único criterio para calcular su calidad nutricional, también es necesario determinar la cantidad liberada de la matriz alimentaria y absorbida por el organismo del ser humano. (Suliburska y Krejpcio, 2014).

Dentro de los minerales el calcio es el más abundante en el ser humano representando el 2% del peso corporal. Este mineral posee importantes funciones dentro de los que se puede mencionar: metabolismo del hueso, segundo mensajero para la activación de diferentes respuestas fisiológicas, transmisión neuromuscular, liberación hormonal y de neurotransmisores, visión, metabolismo de glucógeno, señalización celular y coagulación sanguínea (Farré, 2015) (Gallagher, 2008).

El calcio se absorbe en el intestino delgado de forma mayoritaria en la parte superior del íleon mediante dos mecanismos: El primero es el transcelular o transporte activo

(Farré, 2015), este es un proceso saturable, regulado por la ingesta dietética y necesidades del organismo y además es totalmente dependiente de la vitamina D (Caldera, 2012). El segundo mecanismo es la difusión paracelular o difusión pasiva que se realiza a través de las uniones intercelulares, no es saturable y es independiente de vitamina D y de la edad (Farré, 2015) (Caldera, 2012). La mayor parte de calcio que se absorbe es almacenada en el tejido óseo y aquel no absorbido es eliminado por las heces formando complejos con los ácidos biliares, ácidos grasos libres, ácido oxálico y fítico (Farré, 2015).

El proceso de absorción de calcio depende de factores intrínsecos y extrínsecos, los que en conjunto afectan la biodisponibilidad de este mineral (Binaghi, Pellegrino y Valencia, 2011). Son estos últimos los que afectan potencialmente la biodisponibilidad de calcio, ya que influyen de forma positiva o negativa sobre la superficie de absorción de las células intestinales (Etcheverry, Grusak y Fleige, 2012). Un grupo de autores en el año 2012 mencionan que aquellos factores que favorecen la absorción de calcio son los fosfopéptidos de caseína, inulina (Etcheverry, Grusak y Fleige, 2012), lactosa y vitamina D (Caldera, 2012) y dentro de los que disminuyen la absorción de calcio se encuentran los fitatos, fibra dietética, además de oxalatos (Etcheverry, Grusak y Fleige, 2012).

Existen diferentes modelos para evaluar la biodisponibilidad mineral, dentro de los que se incluyen a los ensayos in vivo e in vitro (Caldera, 2012). Los métodos in vitro constituyen una buena alternativa por el menor costo, rapidez del estudio, menor variabilidad y mayor control sobre las variables y condiciones de estudio, sin embargo, al no ser posible la total reproducción de condiciones fisiológicas sus aplicaciones son limitadas. (Caldera, 2012) (Farré, 2010). Etcheverry y col. reconocen la utilización de los métodos in vitro para comparar la biodisponibilidad del calcio en diferentes matrices alimentarias; así como, para observar la influencia de los antinutrientes (Etcheverry, Grusak y Fleige, 2012).

La fuente principal de calcio son los lácteos y de estos la leche es uno de los alimentos de amplio consumo a nivel mundial debido al contenido de nutrientes esenciales tales como grasa, lactosa, proteínas de alto valor biológico, gran cantidad de calcio mineral, fosforo, magnesio y diferentes vitaminas como B12, B2, D y A (Scholz-Ahrens, Ahrens y Barth, 2019). Además de ello, la leche presenta componentes que favorecen la absorción de calcio en el epitelio intestinal y de esa manera colaboran con una biodisponibilidad importante de este mineral, dentro de los principales factores se

mencionan a la lactosa y los caseinofosfopéptidos (Perales, Barberá, Lagarda y Farré, 2005) los cuales incrementan la permeabilidad y absorción intestinal (Singhal, Baker y Baker, 2017). Otros investigadores señalan que el efecto de los caseinofosfopéptidos como factor predisponente a una elevada biodisponibilidad en la leche de vaca no está del todo establecido. (Martínez, De Arpe y Villarino, 2012). Estas posturas contradictorias deben ser estudiadas y aclaradas.

Además de los productos lácteos en los últimos años se han establecido sucedáneos de la leche, los cuales tienen como materia prima alimentos de origen vegetal tales como almendras, avellanas, arroz, entre otras (Scholz-Ahrens, Ahrens y Barth, 2019). Estos alimentos tienen un contenido de calcio total similar o superior a la leche de vaca, pero la cantidad absorbible es inferior al valor obtenido de los lácteos (Farré, 2015).

En diferentes estudios *in vitro* en productos de origen vegetal se observa una baja biodisponibilidad de calcio debido a la presencia de antinutrientes como oxalatos y fitatos (Weaver, Proulx y Heaney, 1999). En base a ello, se menciona que el contenido de minerales y su posterior absorción pueden variar significativamente dependiendo del tipo de fuente vegetal, el país, el clima, las prácticas agrícolas y el procesamiento del alimento (Suliburska y Krepjco, 2014).

Dentro de la amplia gama de semillas, frutos secos y granos ofertados a nivel mundial y nacional, el ajonjolí y las almendras son dos productos vegetales cuyo consumo se ha difundido en los últimos años y por ende han adquirido mayor importancia. El ajonjolí es una semilla oleaginosa que por su composición química se ha convertido en un excelente agregado nutricional. Es una fuente importante de minerales como magnesio, fósforo y sobre todo calcio. De este último mineral contiene 67 mg por cucharada de 10 g (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio ambiente, 2017). El interés industrial y comercial del producto, así como el cambio de los hábitos de alimentación ha ocasionado un aumento en la demanda de esta semilla (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2004), con un incremento del 9% anual a nivel mundial a partir del año 2000 (Banco Central de Nicaragua, 2004). Por otro lado, la almendra es un fruto con importantes aportes nutricionales dentro de los cuales se incluye su contenido de magnesio y fósforo y al igual que el ajonjolí es una de las fuentes vegetales más ricas en calcio, aportando 50,8 mg por cucharada de 20g, es por ello que es recomendado por especialistas para ser utilizado como sustituto de la leche de vaca cuando esta no es tolerada. (Fundación Española de Nutrición, 2017).

Considerando la información presentada líneas arriba se evidencia que aún hay posturas contradictorias sobre la biodisponibilidad de calcio entre productos lácteos y los de origen vegetal. Debido a la importancia que posee el calcio por sus distintas funciones fisiológicas es necesario conocer la diferencia de biodisponibilidad de este mineral entre sus distintas fuentes.

1.2. Formulación del problema:

¿Cuál es la diferencia en la bioaccesibilidad de calcio disponible entre el ajonjolí (*sesamun indicum*), la almendra (*prunus amygdalus*) y la leche de vaca?

1.3. Justificación:

El presente estudio contribuirá a un mejor conocimiento y entendimiento de la bioaccesibilidad de calcio derivado de los alimentos (ajonjolí y almendra) en el lumen intestinal.

Por otro lado, la determinación y comparación de la fracción biodisponible de calcio de muestras líquidas de ajonjolí, almendras y de la leche de vaca, favorecerá la elaboración de recomendaciones para el consumo de dichos alimentos basadas en evidencias científicas.

Los resultados permitirán llamar la atención sobre el consumo de alimentos de origen vegetal, en especial aquellos productos que anuncian tener calcio como nutriente especial y que podría ser interpretado como un sustituto de leche.

1.4. Objetivo de la Investigación:

1.4.1 Objetivo General

Comparar la bioaccesibilidad de calcio disponible entre las muestras de alimentos líquidos de ajonjolí (*sesamun indicum*), almendra (*prunus amygdalus*) con la bioaccesibilidad de calcio de la leche de vaca utilizando un método in vitro.

1.4.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la fracción bioaccesible de calcio disponible de la muestra líquida de ajonjolí.
- Determinar la fracción bioaccesible de calcio disponible de la muestra líquida de almendra.
- Determinar la fracción bioaccesible de calcio disponible de la leche de vaca.
- Comparar las fracciones bioaccesibles de calcio disponible entre las muestras analizadas.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del Problema

Considerando que la biodisponibilidad es un criterio importante de calidad nutricional diversos estudios se han realizado para determinar la biodisponibilidad de calcio u otros minerales.

Investigadores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires evaluaron la bioaccesibilidad de diferentes minerales (hierro, calcio, magnesio y zinc) en infusiones de yerba mate y en preparaciones de leche fortificada. Para ello se eligieron 3 fuentes de fortificación de hierro (sulfato ferroso, bisglinato ferroso y NaFeEDTA). La biodisponibilidad se midió con el método de dializabilidad, método *in vitro* que realiza una digestión enzimática en condiciones fisiológicas, encontrándose que las infusiones de yerba mate no aportan hierro de forma importante ($p < 0.05$). Sin embargo, cuando se consume junto con leche fortificada no se afecta la disponibilidad del hierro, excepto cuando se somete a la leche a cocción, donde también se afecta la bioaccesibilidad de zinc y magnesio (Binaghi et al. 2011).

Otro estudio realizado en el Departamento de Alimentos y Nutrición de la Universidad Purdue en el año 2003 comparó la biodisponibilidad de la leche de soya fortificada con carbonato de calcio y leche de soya fortificada con fosfato tricálcico en mujeres jóvenes. Se reclutó a 20 mujeres saludables premenopáusicas. Para el análisis se recogió orina de 24 horas y se estableció dos fórmulas, una para determinar la dosis de calcio y otra para determinar la fracción de calcio absorbible. Se obtuvo que la fracción

absorbible de calcio no varió entre la leche de vaca y las leches de soya fortificadas. La biodisponibilidad fue mejor en la leche de soya fortificada con carbonato de calcio (Zhao, Martin y Weaver, 2005).

En el año 2014 se realizó un estudio experimental para evaluar la biodisponibilidad de calcio en leches con citrato y carbonato de calcio. Estas fueron homogenizadas a partículas de tamaño nano y enriquecidas con nutrientes potenciadores de la biodisponibilidad de calcio: inulina, DHA y EPA, vitamina B6, K y D. Se utilizó 24 ratas hembras separadas en 3 grupos (control, ovariectomizadas y ovariectomizadas con osteoporosis), en cada grupo se incluyó 8 ratas. Las leches fueron asignadas al primer y segundo grupo, al tercer grupo se le dio una dieta baja en calcio por seis semanas y posteriormente fueron alimentadas de la misma manera que los grupos anteriores. La medición del calcio se realizó en sangre por punción cardiaca y hueso molido derivado del fémur., Para medir la concentración total de calcio en la dieta, hueso y heces se utilizó espectrofotometría de absorción atómica. Se concluyó que la muestra homogenizada tamaño nano con carbonato de calcio fue más efectiva tanto en biodisponibilidad como en absorción de calcio, por lo que sería efectiva para prevenir la pérdida de masa ósea y fracturas inducidas por osteoporosis (Erfanain, Rasti y Manap, 2014).

En el 2012 se evaluó la composición, digestibilidad proteica y dializabilidad como estimador de la bioaccesibilidad de hierro, zinc y calcio en el guiso de arroz, guiso de lentejas, guiso de fideos y arroz cuatro quesos. La bioaccesibilidad se determinó en muestras crudas y cocidas; y el contenido de hierro, zinc y calcio, por espectroscopía de absorción atómica. La disponibilidad se calculó como el porcentaje de mineral (M) dializado en relación al contenido de mineral total de la muestra, el aporte potencial (AP) se calculó considerando una ración de 100 g de producto crudo que corresponde a 400 g cocido. La bioaccesibilidad de hierro y zinc fue menor en los alimentos cocidos; en caso del calcio no se observó cambios por cocción y el aporte potencial de dicho mineral fue mayor en el guiso de lentejas. Se concluyó que los productos analizados poseen un adecuado balance nutricional (Galán, Gonzáles y Drago, 2013).

Otro estudio realizado en el año 2014 determinó la biodisponibilidad de calcio y vitamina D de la leche fortificada solo con calcio o vitamina D o usando la

combinación de ambos. Se estudió la interacción de estas presentaciones con la biodisponibilidad de hierro y zinc. Se utilizó 32 ratas macho las cuales fueron divididas en 4 grupos: grupo I, alimentado con dieta sintética (67%) y liofilizado de leche (33%); grupo II alimentado con dieta sintética (67%) y leche liofilizada fortificada con calcio (33%); grupo III alimentado con dieta sintética (67%) y leche liofilizada fortificada con vitamina D2 (33%) y grupo IV alimentado con dieta sintética (67%) y leche liofilizada fortificada con calcio y vitamina D2 (33%). Se concluyó que la leche es un medio adecuado para la fortificación y la biodisponibilidad mejora cuando se utiliza suplementos de calcio y la adición de vitamina D incrementa aún más dicho valor. (Kaushik, Sachdeva, Arora, Kapila y Kaur, 2014).

En el 2014, autores argentinos evaluaron el aporte potencial de minerales esenciales en diferentes alimentos y/o dietas además de contemplar el efecto de diversos inhibidores y promotores de la absorción de minerales. Se utilizó un método in vitro denominado dializabilidad que es un indicador de la biodisponibilidad potencial. Se concluyó que el método de diálisis es un buen predictor de bioaccesibilidad de minerales, es útil para comparar la efectividad de las fuentes de fortificación, de los promotores o inhibidores de la absorción; sumado a lo anterior, se comprobó que los oxalatos afectaron la dializabilidad de calcio, hierro y zinc y el efecto de inhibidores fue más evidente cuando se realizó combinación de dietas (Binaghi, 2014).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Biodisponibilidad

2.2.1.1 Definición

Se entiende por biodisponibilidad al grado en el cual el organismo transforma un nutriente determinado en su forma absorbible, utilizado para el cumplimiento de funciones corporales normales, ya sean procesos metabólicos o almacenamiento del mismo en estructuras corporales (Caldera, 2012) (Klobukowski, Skibniewska y Kowalski, 2014). La biodisponibilidad incluye a dos procesos importantes, uno de ellos es la bioaccesibilidad que se define como la cantidad de nutriente que se

encuentra potencialmente disponible para su absorción; el otro proceso es la bioactividad que es un conjunto de eventos que se relacionan con el transporte, llegada a órgano diana, interacción y generación de la respuesta fisiológica (Caldera, 2012) (Etcheverry, Grusak y Fleige, 2012).

2.2.1.2 Métodos para medir la biodisponibilidad

La medición de la biodisponibilidad permite determinar un aporte nutricional adecuado, es por ello que a lo largo de los años se han desarrollado diferentes métodos para su medición, dentro de ellos tenemos a dos grandes grupos: métodos in vitro y métodos in vivo.

Respecto de los métodos in vivo se ha observado que los estudios experimentales en animales tienen resultados cuestionables debido a la diferencia que existe entre especies, principalmente en su velocidad de crecimiento, actividad enzimática, actividad microbiana, fisiología y anatomía intestinal. Por otro lado, el uso de radioisótopos es una técnica sencilla en su determinación, pero requiere de un acelerador de espectrometría de masas, método costoso y no siempre disponible; además de ello, puede constituir un riesgo para los voluntarios debido a las radiaciones ionizantes y su aceptación no es universal por los comités de ética. Por ello se ha determinado a los métodos in vitro como una alternativa adecuada frente a las técnicas in vivo debido a su menor costo, mayor rapidez, menor variabilidad y facilidad para controlar distintas variables (Farré, 2010) (Caldera, 2012).

En el contexto de la alimentación, conocer cómo influyen las características fisicoquímicas y microestructura del alimento en la absorción mineral es de suma importancia y los métodos in vitro nos permiten lograr dicho objetivo, especialmente los ensayos de solubilidad y dializabilidad. Sin embargo, se debe considerar que con los métodos in vitro los resultados obtenidos son útiles para establecer clasificaciones y tamizaje, pero no para adoptar políticas de enriquecimiento de alimentos. (Farré, 2010).

A continuación, se realizará la explicación de los métodos in vitro más utilizados:

A. Solubilidad

Este procedimiento mide la bioaccesibilidad y simula la digestión gastrointestinal considerando una digestión ácida con HCl y una posterior neutralización. La determinación del elemento soluble se realiza por centrifugación o filtración para después medirse por espectrofotometría de absorción atómica. Dicha fracción solubilizada representa la cantidad de mineral disponible para ser absorbido. Es importante considerar que este método presenta algunas limitaciones, principalmente que no evalúa la velocidad de absorción o cinética de transporte. (Caldera, 2012).

B. Dializabilidad

Este método es el que se emplea con más frecuencia y ha sido ampliamente utilizado para el estudio de bioaccesibilidad de micronutrientes como calcio, zinc, magnesio, entre otros. Al igual que la solubilidad mide bioaccesibilidad e involucra dos procesos, la digestión gástrica e intestinal. Este último hace uso de una membrana semipermeable y la proporción del nutriente que atraviesa dicha membrana representa la proporción del nutriente evaluado que está disponible para ser absorbido. Este método favorece la evaluación de la interacción mineral- alimento (Caldera, 2012).

2.2.2 Calcio

2.2.2.1 Definición

El calcio es un elemento químico cuyo número atómico es 20 y en nuestro organismo es el quinto elemento en importancia representando el 2% del peso corporal (Farré, 2015) (Caldera, 2012). Se menciona que alrededor de 1000 g de calcio se encuentran en forma de cristales de hidroxapatita, los cuales contienen 99% de calcio y forman parte del esqueleto óseo (Quesada y Henríquez, 2011). Un menor porcentaje de calcio se encuentra en fluidos celulares, principalmente en la circulación sanguínea, ya sea unida a proteínas, formando complejos con ácidos o en su forma iónica; y en tejidos (Caldera, 2012) (Valencia, Román y Cardona, 2011). A este mineral se le considera como macromineral ya que se requiere consumir una cantidad considerable, generalmente más de 100 mg/día. Asimismo, la concentración normal de calcio en

sangre oscila entre 8.8 y 10.6 mg/dl (Valencia, Román y Cardona, 2011).

2.2.2.2 Absorción de Calcio

El calcio para su absorción se debe encontrar en una forma soluble, generalmente en su forma iónica. El proceso de absorción es más eficaz en el duodeno, sin embargo, la mayor cantidad es absorbida en la porción superior del íleon (65%) y en menor porcentaje en el yeyuno (17%). Se utiliza dos mecanismos: difusión paracelular pasiva y proceso transcelular activo (Fernandez et al. 2011).

La difusión paracelular pasiva se da gracias a las uniones intercelulares y es un proceso no saturable, no depende de vitamina D y se incrementa con la ingesta dietética. El proceso de difusión paracelular involucra el movimiento de agua y solutos, principalmente sodio y glucosa; para el transporte de calcio se da el intercambio de tres moléculas de sodio por una de calcio. Este proceso se encuentra regulado por factores de crecimiento, hormonas, PKC, citoquinas, entre otros factores que aún se desconocen (Farré, 2015).

Un factor importante que influye en este tipo de transporte es el tiempo de permanencia intestinal, el cual es mayor en el íleon y considerando que esta porción no posee calbindina, la proporción de cuánto se absorbe varía entre especies. Este tipo de transporte tiene una participación importante cuando la dieta es alta en calcio (Caldera, 2012) (Farré, 2015).

El proceso transcelular activo a diferencia del proceso paracelular es saturable, depende totalmente de la vitamina D y se encuentra regulado por la ingesta dietética y las necesidades del organismo. En este tipo de transporte se consideran tres etapas (Fernandez et al. 2011): La primera de ellas es cuando se produce la entrada de calcio desde el lumen al enterocito, proceso que se da a favor de la gradiente del calcio y utiliza canales específicos de calcio que están en el ribete en cepillo y son TRPV6 y TRPV5, cuya expresión también se ha notificado en el riñón. La segunda etapa está mediada por una proteína ligadora de calcio denominada calbindinaD-9k que participa en el transporte de calcio a la membrana basolateral. La tercera y última etapa es aquella donde se da el paso de calcio hacia el medio intracelular, este paso es contragradiente y requiere de la enzima Ca-ATPasa, además de un cotransportador

Na⁺/Ca²⁺ (Caldera, 2012) (Farré, 2015).

Es importante mencionar que en el proceso transcelular cada etapa posee un componente que depende de calcitriol y se ha observado que la calbindina D9k es la más sensible a esta vitamina y por ende el componente más limitante (Quesada y Henríquez, 2011). Además de ello, cabe resaltar que el transporte de calcio también se puede dar por vesículas endosómicas y lisosómicas (Caldera, 2012) (Farré, 2015).

A diferencia de la difusión paracelular este tipo de transporte mejora frente a niveles bajos de calcio y ante el incremento de las necesidades de este mineral, ya sea por crecimiento, embarazo, lactancia, etc. (Farré, 2015).

2.2.2.3 Funciones del calcio (Caldera, 2012) (Farré, 2015)

Dentro de las funciones principales del calcio podemos mencionar a las siguientes:

- Otorga fuerza a la estructura ósea, ya que constituyen los cristales de hidroxapatita presentes en los huesos y dientes.
- Regula la función cardíaca.
- Forma parte de diferentes sistemas enzimáticos (proteasas y deshidrogenasas).
- Participa en la secreción glandular.
- Es segundo mensajero para diferentes procesos fisiológicos como contracción muscular, liberación de hormonas y neurotransmisores, coagulación sanguínea, proliferación celular, señalización celular, etc.

2.2.2.4 Factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la biodisponibilidad de calcio

Se han determinado diferentes factores que afectan la absorción de calcio, dentro de estos tenemos a los de tipo fisiológico o intrínsecos y aquellos de tipo dietético o extrínsecos.

En el caso de los factores intrínsecos encontramos a la disminución del pH intestinal y ello se debe a que un medio ácido a nivel de estómago y duodeno es fundamental para la liberación del calcio de la matriz alimentaria y de esa manera favorecer su absorción en el intestino; por lo tanto, en condiciones de hipoclorhidria o aclorhidria

la absorción de calcio se ve disminuida (Quesada & Henríquez, 2011). Otro factor intrínseco es la presencia de vitamina D cuyo aporte en la absorción de calcio es fundamental ya que participa en el proceso transcelular descrito líneas arriba, asimismo la vitamina D es una hormona que regula las concentraciones de calcio especialmente cuando los niveles séricos son bajos. Es importante mencionar que cuando hay una deficiencia de vitamina D la absorción de calcio disminuye en un 15% (Quesada y Henríquez, 2011). Otros factores intrínsecos de importancia son también el incremento de necesidades durante el embarazo, crecimiento y lactancia, la edad, intolerancia a la lactosa, entre otros (Caldera, 2012).

Respecto de los factores extrínsecos tenemos a los componentes de la dieta ya que en el intestino se da la interacción de este mineral con otro tipo de nutrientes. Así tenemos que la presencia de aminoácidos, péptidos, citratos, lactosa, fructooligosacáridos y fosfopéptidos de caseína favorecen la absorción de calcio (Valencia, Román y Cardona, 2011). En el caso de los fosfopéptidos de caseína que se forman a partir de la hidrólisis de la caseína se ha observado que presentan residuos de fosfoserina que se une a calcio evitando la formación de complejos insolubles (Etcheverry, Grusak y Fleige, 2012). Por otro lado, los fitatos presentes en cereales, menestras y semillas; los oxalatos que se encuentran en las hojas verdes; ácidos grasos de cadena larga; fosfatos y alto contenido de fibra pueden disminuir la absorción de calcio ya que se forman complejos insolubles (Valencia, Román y Cardona, 2011).

2.2.3 Fuentes alimentarias de calcio

2.2.3.1 Lácteos

La leche y derivados lácteos, ya sean yogures o quesos son considerados como la mejor fuente de calcio debido a su alto contenido y biodisponibilidad, donde el porcentaje de absorbabilidad es de 32%. Asimismo, la leche presenta características específicas que la convierten en una buena fuente de calcio, así tenemos que el calcio unido a la caseína se libera rápidamente en la digestión paracelular y su biodisponibilidad es elevada; por otro lado, el calcio unido a péptidos y proteínas de la leche permite que este se mantenga en disolución ante alteraciones en el pH; además su absorción puede darse

en el intestino distal en ausencia de vitamina D. Todos estos factores le proporcionan a la leche una alta absorbabilidad (Farré, 2015).

A. Contenido de calcio en productos lácteos

A continuación, se presenta el contenido de calcio por 100 g de alimento de acuerdo a las tablas de composición de alimentos del Instituto Nacional de Salud (Reyes, Gómez-Sánchez, Espinoza, Bravo y Ganoza, 2017).

Tabla 1. Contenido de calcio en diferentes derivados lácteos * (Reyes, Gómez-Sánchez, Espinoza, Bravo, Ganoza, 2017)

Nombre del alimento	Calcio (mg)
Leche en polvo descremada	1257
Leche en polvo entera	848
Leche evaporada entera	231
Leche fresca de cabra	171
Leche fresca de vaca	106
Queso fresco de vaca	783
Queso fresco de cabra	310

*Elaboración propia

B. Consumo de lácteos en el Perú

Según la encuesta de consumo per cápita de los principales alimentos realizado por el INEI en el periodo de 2008-2009 se determinó que el producto lácteo de mayor consumo es la leche evaporada con un equivalente de 10,5 litros al año y considerando el área geográfica el consumo es mayor es a nivel urbano con 12,7 litros al año, cinco veces mayor que el área rural. Asimismo, se determinó un mayor consumo en la costa con 8,3 litros. En segundo lugar de consumo se ubica la leche fresca con un total de 4,9 L/persona (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2009).

Tabla 2.
Consumo promedio per cápita anual de productos lácteos por ámbito geográfico, según principales productos lácteos (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2009)

Principales productos lácteos	Total	Lima Metropolitana	Resto País	Área	
				Urbana	Rural
Leche evaporada (Litro)	10.5	16.4	7.9	12.7	2.8
Leche fresca (Litro)	4.9	0.4	6.9	4.3	7.1
Leche fresca pasteurizada y UHT (Litro)	1.2	3.3	0.2	1.5	0.0

* Elaboración propia

2.2.3.2 Semillas

A. Ajonjolí

También denominado sésamo es una planta recta, que puede o no presentar ramificaciones; su tallo puede alcanzar una altura de 2 m; sus hojas de color verde tienen forma acorazonada y sus flores son blancas o en algunos casos tienen un ligero color lila y miden entre 2 a 4 cm. La semilla de ajonjolí mide entre 2 a 4 mm es achatada, color variable que va de blanco cremoso a negro. Hoy en día esta semilla es muy utilizada en la gastronomía y a nivel nutricional, ya que se le atribuye propiedades como reducción de los niveles de colesterol gracias al predominio de ácidos grasos poliinsaturados (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2004), especialmente omega 6 y 9 (Saravia y Espinoza, 2014). Asimismo, esta semilla tiene un contenido importante de fibra que regula la función intestinal; además aporta cantidades importantes de aminoácidos (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2004).

Además de lo mencionado anteriormente el interés nutricional en esta semilla se debe a los diferentes minerales que aporta, resaltando principalmente el calcio, ya que en una porción de 100 gramos aporta el 81% de calcio requerido por las mujeres y el 65% que se requiere durante el embarazo (Saravia y Espinoza, 2014).

De acuerdo a las tablas de composición de alimentos elaborada por el Instituto Nacional de Salud (INS) se tiene que la composición nutricional del ajonjolí es la siguiente (Reyes, Gómez- Sánchez, Espinoza, Bravo y Ganoza, 2017):

Tabla 3. Composición nutricional de la semilla de ajonjolí en 100 g* (Reyes, Gómez- Sánchez, Espinoza, Bravo, Ganoza, 2017)

Energía (Kcal)	573
Proteína (g)	17.73
Grasa total (g)	49.67
Carbohidratos (g)	23.45
Fibra dietaria total (g)	11.80
Calcio (mg)	975
Fósforo (mg)	629
Hierro (mg)	14.55

* Elaboración propia

B. Almendra

La almendra forma parte de la familia de las rosáceas y es un fruto de cáscara dura de color marrón-beige, tiene forma de lágrima y mide entre 1 a 2 cm. Es el fruto del árbol del almendro, el cual llega a medir 10 m de altura. Existen dos variedades que son las almendras dulces y amargas, de estas la que se consume como fruto seco es la variedad dulce. La importancia de este fruto recae en el importante aporte de grasas insaturadas, las cuales previenen enfermedades cardiovasculares; asimismo presenta un importante aporte de fibra, el cual es mayor que los otros frutos secos (Fundación Española de Nutrición, 2017).

Al igual que el ajonjolí, también destaca su aporte de minerales como fósforo, magnesio, hierro, potasio y sobretodo calcio; considerándose como la fuente vegetal más rica en aportar calcio y por ello muchos profesionales la recomiendan como sustituto de la leche en situaciones de intolerancia a la lactosa. Una porción de 100 g de almendra aporta 254 mg de calcio (Fundación Española de Nutrición, 2017).

De acuerdo a las tablas de composición de alimentos elaborada por el Instituto Nacional de Salud (INS) se tiene que la composición nutricional de la almendra es la siguiente (Reyes, Gómez-Sánchez, Espinoza, Bravo y Ganoza, 2017):

Tabla 4. Composición nutricional de la semilla de almendra en 100 g* (Reyes, Gómez-Sánchez, Espinoza, Bravo, Ganoza, 2017)

Energía (Kcal)	552
Proteína (g)	23.4
Grasa total (g)	54.1
Carbohidratos (g)	14.3
Fibra dietaria total (g)	9.9
Calcio (mg)	195
Fósforo (mg)	440
Hierro (mg)	3.72

*Elaboración propia

c. Antinutrientes en ajonjolí y almendra

Los antinutrientes o sustancias antinutritivas son compuestos presentes de forma natural en algunos alimentos y principalmente están ampliamente distribuidas en alimentos de origen vegetal y si bien no representan un riesgo de toxicidad, si implican una disminución significativa del valor nutricional de semillas, oleaginosas, legumbres y cereales, ya que su acción la realizan a nivel del tracto gastrointestinal o en el mismo alimento (Febles, 1998). En el caso especial del ajonjolí se tiene como principales antinutrientes al ácido oxálico y al ácido fítico. El ácido oxálico ocasiona un pronunciado efecto sobre la biodisponibilidad del calcio, produciendo un descenso en los niveles sanguíneos. Se menciona que 2,5 gramos de ácido oxálico precipitan 1 gramo de calcio y aquellos alimentos que posean una relación ácido oxálico: calcio mayor a 2.25 deben ser considerados descalcificantes (Febles, 1998). En el caso del ácido fítico se ha observado que disminuye significativamente la biodisponibilidad de calcio y ello se debe a que el fitato presenta una alta afinidad por el calcio y su precipitación se da a niveles de pH bajos (Febles, 1998). Asimismo, es importante mencionar que el ser humano no posee suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) con la capacidad de liberar los minerales y dentro de ellos el calcio de la estructura del fitato disminuyendo su absorción y por ende sus efectos fisiológicos en el organismo (Martínez, Ibañez y Rincón, 2002).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y Diseño de Investigación

El diseño de la investigación es observacional cuantitativa con alcance explicativo.

3.2 Unidad de Análisis

La unidad de análisis se encuentra constituida por la leche de vaca pasteurizada (RS-DIGESA/A1100515N NALISA) obtenida de vacas pertenecientes a ganado criollo y en menor porcentaje a la raza Holstein. La leche fue envasada en el distrito de Ate Vitarte de Lima y se utilizó para su análisis 48 horas después de ser adquirida.

Las muestras de alimentos líquidos de ajonjolí y almendra también constituyen parte de la unidad de análisis. Para su elaboración se utilizaron semillas de ajonjolí (RNE: 01001774) y almendras (R.S. 000118-MINAGRI-SENASA) respectivamente.

3.3 Población de Estudio

La población estuvo constituida por la leche de vaca entera Laive y el ajonjolí (*sesamun indicum*) y almendra (*prunus amygdalus*) de diferentes proveedores.

En el caso de la leche de vaca la muestra se obtuvo de un supermercado peruano en presentación de 900 ml y como se mencionó anteriormente se encontraba pasteurizada. Para la elección del tipo de leche se consideró la encuesta realizada por el Instituto Nacional de Estadística e Informática que menciona que en el Perú la leche fresca es la segunda más consumida (INEI, 2009). Asimismo en el informe del Ministerio de Agricultura y Riego se señala que la marca Laive es una de la más consumidas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2017). Es importante mencionar que además de lo mencionado anteriormente se decidió utilizar leche fresca y de la marca Laive porque

no es fortificada con calcio a diferencia de otras marcas.

En el caso del ajonjolí la muestra estuvo conformada por semillas de ajonjolí blanco perteneciente a la distribuidora Natural Seed, empresa argentina vigente desde el año 2012 que ha sido creada por profesionales del rubro alimentario. La presentación adquirida fue de 200g contenido en un envase trilaminado que resguarda a las semillas de la luz y oxígeno del ambiente; para su conservación hasta la preparación de la muestra líquida las semillas se mantuvieron en su envase original y fueron utilizadas 48 horas después de haber sido adquiridas.

Para el caso de la almendra la muestra estuvo conformada por almendras crudas obtenidas de la distribuidora Frutos y Procesos SAC, empresa peruana que inició actividades en el año 2008 y se encarga de la elaboración y producción de productos naturales. La presentación adquirida fue en bolsas envasadas al vacío de 100 g donde fueron mantenidas hasta su uso para la elaboración de la muestra líquida. Al igual que el ajonjolí se utilizaron las almendras 48 horas después de su compra.

La elección del ajonjolí y la almendra se basó en estudios que mencionan su alto contenido de calcio y el uso que están haciendo de los mismos para la elaboración de sustitutos de leche de vaca (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio ambiente, 2004) (Fundación Española de Nutrición, 2017)

Para cada una de las muestras de alimentos se hizo el experimento por triplicado.

3.4 Selección de la Muestra

Se utilizó la variedad de ajonjolí blanco debido a que las otras variedades (rojo y negro) tienen poca participación en el mercado de nuestro país y sus costos suelen ser más elevados (Saravia y Espinoza, 2014). Asimismo, gran parte de los profesionales recomiendan el uso de ajonjolí blanco para la elaboración de las muestras líquidas de ajonjolí.

3.5 Técnicas de recolección de Datos

3.5.1 Recolección de la muestra:

Leche:***a. Obtención de la muestra***

La leche fresca entera pasteurizada Laive se obtuvo de un supermercado peruano. La presentación adquirida fue en bolsa de polietileno con un contenido de 900 ml.

b. Transporte y almacenamiento

La leche se colocó en un cooler de 5L con sustitutos de hielo para mantener la temperatura especificada entre 4 a 6°C. Posteriormente la leche fue almacenada en un refrigerador a la misma temperatura hasta que se dé su procesamiento.

c. Procesamiento de la muestra

Se separó la leche en tres partes de 200 ml cada una y cada parte fue colocada en bickers.

Ajonjolí y Almendra***a. Obtención de la muestra***

El ajonjolí blanco fue adquirida de la distribuidora Natural Seed y la almendra se adquirió de la distribuidora Frutos y Procesos SAC. Ambos productos se compraron envasados en bolsas de polietileno en cantidades de 200 g y 100 g, respectivamente.

b. Transporte y almacenamiento

Para el transporte de ambos alimentos se utilizó un envase fresco, limpio y seco y para el almacenamiento se colocaron en un lugar limpio con una temperatura entre 18 a 20°C y 70% de humedad.

3.5.2 Procesamiento de la muestra (en base a lo recomendado por nutricionistas)

a. Elaboración de la muestra de alimento líquido de ajonjolí

Para su preparación se pesó 120 gramos de ajonjolí y se dejó remojar en agua desionizada por 8 horas y transcurrido este tiempo se desechó el agua y se colocó las semillas de ajonjolí en la licuadora junto con 540 ml de agua desionizada. Una vez licuado se coló utilizando una bolsa de tela.

b. Elaboración de la muestra de alimento líquido de almendra

Para su preparación se pesó 120 gramos de almendra y se dejó remojar en agua desionizada por 8 horas y transcurrido este tiempo se desechó el agua y se colocó las semillas de almendra en la licuadora junto con 540 ml de agua desionizada. Una vez licuado se coló utilizando una bolsa de tela.

Ambas muestras fueron colocadas en bickers de vidrio y almacenadas en refrigeración hasta su análisis. El tiempo que las muestras permanecieron en refrigeración fue de 24 horas.

3.5.3 Determinación de dializabilidad de calcio (Ver Anexo 2 – Flujograma)

Para la determinación de la dializabilidad de calcio de las muestras analizadas se utilizó un método in vitro desarrollado por Miller y colaboradores (Miller et al., 1981) y modificado por Wolfgor y colaboradores (Wolfgor et al., 2002). Dicho procedimiento consiste en un proceso de digestión enzimática y absorción en condiciones semejantes a las fisiológicas. Cabe resaltar que la parte experimental se realizó en el laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los materiales e instrumentos se detallan en el **Anexo 1**.

Inicialmente se pesaron 50 gramos de cada muestra en matraces de Erlenmeyer y se adicionó 5 ml de alfa-amilasa al 3% a cada una de ellas, se cubrieron con parafilm y se incubaron por 30 minutos en baño maría (37°C) con agitación constante (60 rpm). Transcurrido dicho tiempo se midió el pH y se tituló con HCl 6 N para lograr un pH de 2, posteriormente se adicionó 1.6 ml de pepsina a cada Erlenmeyer y se incubó en baño maría (37°C) con agitación constante por 2 horas; ello para simular el proceso de

digestión gástrica. En el caso de la pepsina cabe resaltar que la relación es de 16 g/100 ml y se enrazó con HCl 0.1 N.

Después del proceso de digestión gástrica se traspasó 15 gramos de cada muestra en dos frascos rotulados y esterilizados, luego se colocaron las bolsas de diálisis (Spectrapore Molecular Weight cut-off 6000-8000 KDa) que contenían 18.75 ml de buffer PIPES llevándolas a incubación por una hora. Tanto la molaridad como el pH del buffer se estableció para cada muestra luego de determinar los mEq totales de cada una; para dicho procedimiento se utilizó como base las fórmulas establecidas por Drago y col., 2005 (Drago y cols., 2005).

Después de la hora de incubación se midió el pH y se colocó 3.75 ml de la solución de bilis- pancreatina y se llevó a incubar por dos horas en baño maría (37°C) con agitación constante. La solución de bilis-pancreatina fue preparada previamente, para ello se consideró la relación de 2.5% bilis y 0.4% de pancreatina las que fueron enrazadas con NaOH 0.1 N.

Transcurridas las dos horas se removieron las bolsas de diálisis, se enjuagaron con agua desionizada y se pesaron los contenidos en tubos de mineralización.

Para la lectura de los minerales se siguió el procedimiento de espectrofotometría de absorción atómica (AOAC, 2000) y se utilizó una mineralización por vía húmeda. Para ello, al contenido de las bolsas de diálisis después de ser pesadas, se les colocó 5ml de ácido nítrico y 5ml de ácido perclórico y los tubos de mineralización fueron llevados al mineralizador donde estuvieron aproximadamente 12 horas. Después de ello el contenido se traspasó a tubos de ensayo y se enrazó a 20 ml con agua desionizada y antes de la lectura en el espectrofotómetro se diluyó con cloruro de lantano para evitar la interferencia de los fosfatos.

Para el cálculo de la dializabilidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Dializabilidad \% del mineral} = \frac{\text{mg de mineral dializado}}{\text{mg de mineral total de la muestra}} \times 100$$

Además, se calculó el aporte potencial de calcio en las muestras analizadas considerando la siguiente fórmula:

$$\text{AP} = \frac{[\text{Ca}^{+2}] \text{ en } 100\text{g de muestra} \times \%D}{100}$$

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico STATA versión 14. Las variables numéricas fueron resumidas mediante promedio y desviación estándar. Los aportes potenciales y porcentajes de cobertura fueron determinados en base a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y expresado con medida de tendencia central y de dispersión.

4.1.1 Contenido de calcio en las muestras analizadas

Tabla 5.
Valores de calcio y porcentaje de calcio dializado de acuerdo al tipo de muestra estudiada.^a

	Calcio ^b		% calcio dializado ^c	
	Promedio	DE	Promedio	DE
Leche de vaca	102.94	8.29	20.71	3.62
Muestra líquida de almendras	24.52	3.95	8.71	2.06
Muestra líquida de ajonjolí	6.52	1.13	6.84	0.41

DE: desviación estándar

a. Se analizaron 4 muestras por cada tipo de muestra estudiada.

b. Valores expresados en mgr por 100 ml de la muestra analizada.

c. El porcentaje de calcio dializado fue determinado en base a una muestra menos en el caso de la leche de vaca y 2 muestras menos en el caso de la muestra líquida de ajonjolí debido a contaminación.

Considerando el contenido total de calcio en las muestras analizadas se puede apreciar que, en una muestra de 100 ml, la leche de vaca contiene mayores cantidades de calcio (102.94 mg) superando en más del doble al valor de calcio de la muestra líquida de almendras y sobre todo al de la muestra líquida de ajonjolí.

Cuando se compara el porcentaje de calcio dializado, se observa que la muestra con

mayor porcentaje dializable, corresponde a la leche de vaca y al igual que el caso anterior, el porcentaje es mayor al de las otras muestras líquidas en estudio, lo que indicaría que la bioaccesibilidad y por lo tanto la fracción disponible para ser absorbida en el tracto gastrointestinal de la leche es mayor en comparación a las otras muestras.

4.1.2 Aporte potencial y porcentaje de cobertura de calcio de las muestras analizadas

Para el cálculo del aporte potencial se consideraron diferentes porciones dependiendo del grupo etario. Asimismo, considerando que las muestras líquidas de almendra y ajonjolí son consumidas por la población en reemplazo de la leche de vaca se ha considerado para estas muestras las mismas porciones que las guías recomiendan en el caso de la leche de vaca.

Para establecer las porciones se siguió las recomendaciones dadas por la Organización Mundial de Salud y La Organización Panamericana de Salud y se detallan a continuación (Organización Mundial de la Salud, 2010), (Madruga y Pedrón, 2020), (Instituto Nacional de Salud, 2014) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2020) .

- Para niños mayores de un año se recomienda el consumo de 200 a 400 ml/día de leche siempre y cuando se acompañe de otros alimentos de origen animal. En caso contrario se recomienda el consumo de 300 a 500 ml/día. Para efectos de análisis se utilizó la primera opción sacando un promedio que equivale a 300 ml/día.
- Para niños de 10 a 18 años y personas adultas se recomienda el consumo de 700 ml/día de leche o derivados lácteos. Para efectos de análisis se consideró un consumo único de leche como fuente de calcio.

Para determinar el porcentaje de cobertura de calcio en diferentes grupos etarios se consideró las recomendaciones de ingesta diaria dadas por la Organización Mundial de Salud (OMS) y la Organización de las naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) que se detallan a continuación:

Tabla 6. Requerimiento diario de calcio en diferentes grupos etarios* (Organización Mundial de la Salud, 2010)

GRUPO DE EDAD	REQUERIMIENTO DIARIO DE CALCIO (mg/d)
Infantes (7-12 meses)	270
Niños (1-3 años)	500
Niños (4-6 años)	800
Adolescentes (10-18 años)	1300
Adultos (19-más)	1000

*Elaboración propia

Las tablas y gráficos para cada caso se muestran a continuación:

Tabla 7.

Contenido de calcio en 100 ml de muestra y porcentaje de cobertura del requerimiento diario en los diferentes grupos etarios

	Calcio (mg/100 ml)	% cobertura para 1 a 3 años ^a	% cobertura para 4 a 6 años ^b	% cobertura para 10 a 18 años ^c	% cobertura para 19 a más años ^d
Leche de vaca	102.94	20.6	12.9	7.9	10.3
Muestra líquida de almendras	24.52	4.9	3.1	1.9	2.5
Muestra líquida de ajonjolí	6.52	1.3	0.8	0.5	0.7

a. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS para 1 a 3 años (500 mg/día).

b. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS para 4 a 6 años (800 mg/día).

c. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS para 10 a 18 años (1300 mg/día).

d. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS para 19 a más años (1000 mg/día).

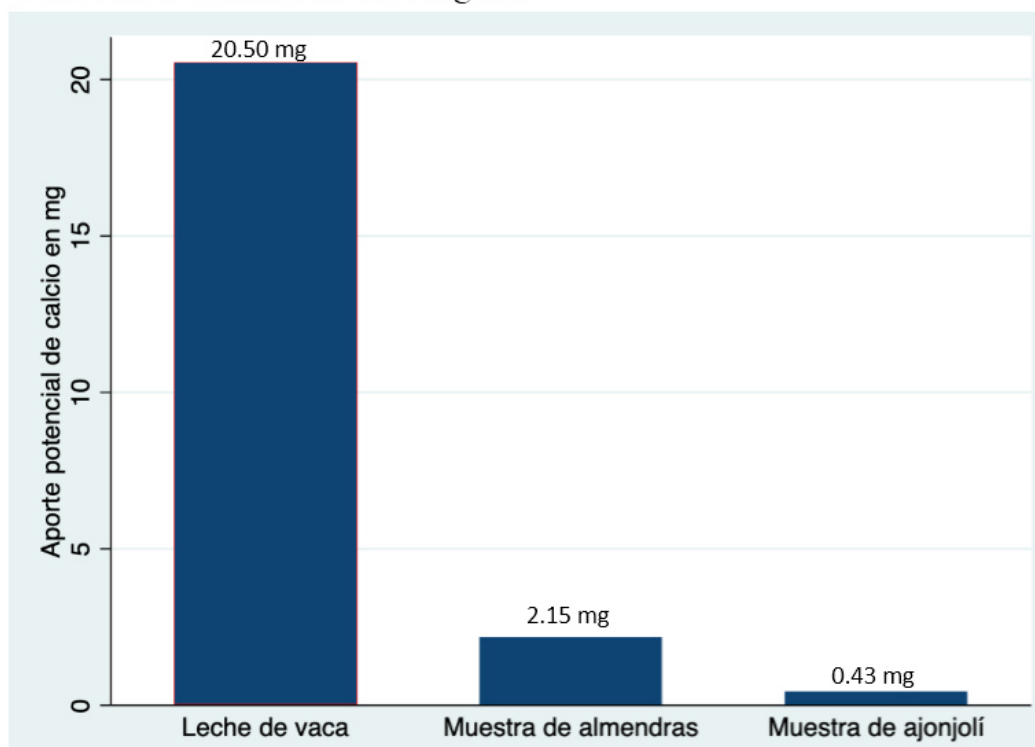
Considerando el contenido de calcio en 100 ml de muestra analizada se puede observar que la leche fresca de vaca tiene un porcentaje de cobertura de calcio de 20.6% y 12.9% para niños de 1 a 3 años y de 4 a 6 años respectivamente. Dicho valor difiere del porcentaje de calcio cubierto por las muestras líquidas de almendra y ajonjolí, las cuales cubren menos del 5% y el 2%, respectivamente para niños de 1 a 6 años, por lo que no serían alimentos recomendados como fuente de calcio para este grupo poblacional. En el caso de los adolescentes y adultos el porcentaje de calcio cubierto

por la leche de vaca es de 8 a 10 % mientras que las muestras líquidas de almendra y ajonjolí cubren entre el 0.7 al 3% del requerimiento de calcio respectivamente.

a. Aporte potencial por cada 100 ml de muestra líquida

Gráfico 1.

Cantidad promedio de calcio potencialmente absorbible por cada 100 ml de las tres muestras investigadas



Nota: Gráfico elaborado en base a datos propios.

La leche de vaca en 100 ml de alimento aporta 20.50 mg de calcio, valor que es mayor que el calcio aportado por la muestra líquida de almendras y la muestra líquida de ajonjolí con valores de 2.15 mg y 0.43 mg de calcio en 100 ml de muestra, respectivamente (ver gráfico 1).

b. Aporte potencial y porcentaje de cobertura de calcio para niños de 1 a 6 años

El aporte potencial de calcio en una porción de 300 ml es mayor en la leche de vaca comparado con las muestras líquidas, asimismo la leche cubre el 12% del requerimiento diario de calcio en niños de 1 a 3 años y el 8% en niños de 4 a 6 años (ver tabla 8).

Tabla 8.

Aporte potencial promedio de calcio y porcentaje de cobertura del requerimiento diario en niños de 1 a 6 años.

	Aporte potencial ^a	% cobertura para 1 a 3 años ^b	% cobertura para 4 a 6 años ^c
Leche de vaca ^{X(±DE)}	61.51 (± 7.07)	12.30	7.69
Muestra líquida de almendras ^{X(±DE)}	6.45 (± 2.11)	1.29	0.81
Muestra líquida de ajonjolí ^{X(±DE)}	1.30 (± 0.45)	0.26	0.16

X: promedio. DE: desviación estándar

a. Resultados expresados en mg. basados en el volumen recomendado por la OMS para niños de 1 a 6 años (300 ml).

b. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS para 1 a 3 años (500 mg/día).

c. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS para 4 a 6 años (800 mg/día).

c. Aporte potencial y porcentaje de cobertura de calcio para adolescentes y adultos

El aporte potencial de calcio en una porción de 700 ml es mayor en la leche de vaca comparada con las muestras líquidas, y el porcentaje de cobertura es de 11% y 14% en adolescentes y adultos, respectivamente (ver tabla 9).

Tabla 9.

Aporte potencial promedio de calcio y porcentaje de cobertura del requerimiento diario en adolescentes y adultos.

	Aporte potencial ^a	% cobertura en adolescentes ^b	% cobertura en adultos ^c
Leche de vaca ^{X(±DE)}	143.52 (± 16.49)	11.04	14.35
Muestra líquida de almendras ^{X(±DE)}	15.05 (± 4.93)	1.16	1.50
Muestra líquida de ajonjolí ^{X(±DE)}	3.04 (± 1.05)	0.23	0.30

X: promedio. DE: desviación estándar

a. Resultados expresados en mg. basados en el volumen recomendado por la OMS para adolescentes y adultos (700 ml).

b. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS para adolescentes (1300 mg/día).

c. Basado en el requerimiento diario de calcio recomendado por la OMS adultos (1000 mg/día).

Considerando que el aporte potencial se define como la cantidad potencialmente absorbible de calcio se puede observar que de las diferentes muestras analizadas se evidencia que la leche fresca de vaca es la que aporta mayor cantidad de calcio por porción en diferentes etapas de la vida de una persona, a diferencia de las muestras líquidas de almendra y ajonjolí, de las cuales la de ajonjolí es aquella que menos aporte de calcio posee.

En el caso del porcentaje de cobertura de calcio para los diferentes grupos etarios la leche fresca de vaca es la que presenta un porcentaje de cobertura mayor de calcio, cubriendo, en el caso de niños de 1 a 6 años alrededor del 12%, considerando una porción de 300 ml, en los adolescentes y adultos la cobertura de calcio es de un aproximado de 13%. A diferencia de la leche de vaca las muestras líquidas de almendra y ajonjolí cubren alrededor del 2% del requerimiento diario de calcio. En base a ello se puede mencionar que la leche fresca de vaca tiene un importante aporte de calcio en diferentes edades a diferencia de los sustitutos de ajonjolí y almendra.

CAPÍTULO V: DISCUSIONES

I. Contenido de calcio en 100 ml de muestra

1.1 Leche de vaca

En el estudio realizado se obtuvo que 100 ml de leche entera de vaca posee una cantidad equivalente a 102.94 mg de calcio. Dicho valor es ligeramente mayor al reportado por Roig y col. donde se menciona que el contenido de calcio en 100 ml es de 94.8 mg (Roig et al. 1999). Por otro lado, el valor obtenido en nuestro estudio es menor que el mencionado por Soto y cols. (2014), donde se reporta un valor de 122.6 mg de calcio (Soto et al. 2014), dicha diferencia también se presenta al compararlo con el estudio de Singhal, Baker & Baker (2017) y el de Weaver, Proulx y Heaney (1999) donde el valor reportado de calcio en la leche de vaca es de 138 mg y 125 mg respectivamente. Cabe mencionar que, pese a existir una diferencia en la cantidad de calcio esta no es radical y puede explicarse por la diferencia de procedencia de la leche, por la especie de las vacas de la cual se obtiene la leche y por la diferencia de métodos aplicados para la determinación de calcio en cada muestra.

1.2 Muestra líquida de almendras

Se encontró un contenido de calcio en la muestra líquida de almendras de 24.52 mg Ca/100 ml, valor inferior comparado el valor que presenta la almendra entera, cuyo valor reportado por el INS es de 195 mg Ca/100 g de muestra (Reyes, Gómez-Sánchez, Espinoza, Bravo y Ganoza, 2017). El valor obtenido en el estudio es inferior al

reportado en el estudio de Vitoria donde las 22 marcas comerciales de “leche” de almendras analizadas contienen en promedio 64 mg/100 ml (Vitoria, 2017) y difiere significativamente del realizado por Chalupa-Krebzdak; Long y Bohrer quienes analizaron 5 marcas comerciales de “leche de almendras” y obtuvieron un valor promedio de calcio de 160 mg/100 ml (Chalupa-Krebzdak, Long y Bohrer, 2018). Dichas diferencias se deben a que en las muestras analizadas en los estudios mencionados se utilizaron marcas comerciales que fueron suplementadas con carbonato de calcio o fosfato de calcio lo que incrementaría su valor de calcio a diferencia de la muestra utilizada en el presente estudio, el cual se obtuvo por técnica casera realizando la molienda y posterior colado de la almendra sin adicionar ningún aditivo especial.

1.3 Muestra líquida de ajonjolí

El contenido de calcio de la muestra líquida de ajonjolí fue de 6.52 mg/100 ml, dicho valor es inferior al que posee la semilla, de acuerdo a las tablas de composición nutricional 2017, la semilla de ajonjolí presenta un valor de 975 mg de calcio en 100 g (Reyes, Gómez-Sánchez, Espinoza, Bravo y Ganoza, 2017); lo que supera significativamente al que se obtiene de la muestra líquida de ajonjolí analizada. Dicha diferencia puede darse por el procesamiento de la semilla para obtener la muestra líquida, ya que en el proceso de colado gran parte de la porción comestible es desechada, lo que podría generar una disminución considerable del contenido de calcio. A diferencia de las almendras, en el mercado no se han desarrollado muchos leches comerciales que provengan de esta semilla, por ello no se han desarrollado muchos estudios en torno a su composición y no se puede realizar una comparación directa. Sin embargo, se realizará la comparación con otras oleaginosas que han sido estudiadas, Chalupa-Krebzdak; Long y Bohrer (2018) analizaron 2 marcas de leches comerciales de cashew y reportaron un valor promedio de calcio de 98.5 mg calcio/100 ml, asimismo estudiaron una marca comercial de “leche de cáñamo” obteniendo un valor de 12 mg calcio/100 ml. En ambos casos los valores reportados son mayores que los de la muestra líquida de ajonjolí analizada y cabe mencionar que al igual que las leches comerciales de almendra estas también fueron suplementadas con fosfato tricálcico.

II. Bioaccesibilidad de las muestras analizadas

Para la determinación de bioaccesibilidad se utilizó la técnica de dializabilidad cuyos puntos de corte fueron establecidos por Kamchan, Puwastien, Sirichakwal y Kongkachuichai (2004). En base a ello se determinó que la leche posee alto nivel de dializabilidad (22-39%); la muestra líquida de almendras tiene niveles medios de calcio dializable (10-18%) y la muestra líquida de ajonjolí posee niveles bajos de calcio dializable (2-7%).

2.1 Bioaccesibilidad de calcio en la leche de vaca

La dializabilidad, usada en la presente investigación, es una técnica *in vitro* que permite determinar la bioaccesibilidad de un mineral, con la que se obtuvo un porcentaje de dializabilidad de 20.71% en la leche de vaca, valor que es similar al reportado por un estudio realizado en España (Roig, Alegría, Barberá, Farré y Lagarda, 1999), el cual reportó que la leche de vaca posee un porcentaje de dializabilidad de 20.0 ± 0.9 %; la mínima diferencia puede deberse a que en este último estudio la membrana de diálisis utilizada fue de 10 000 – 12 000 KDa a diferencia de la utilizada en esta investigación que fue de 6000 – 8000 KDa, lo que pudo generar variación en el transporte pasivo del calcio.

Por otro lado, un estudio realizado en carnes, utilizó a la leche como muestra control, obtuvo un porcentaje de calcio disponible para la leche de 23.19 ± 0.02 %, valor que es mayor al obtenido en esta investigación. Dicha diferencia se pudo dar debido a la aplicación de diferentes metodologías, ya que el estudio que evaluó las carnes utilizó el método de Caco-2 que emplea una monocapa de células con función de absorción a diferencia de esta investigación que utilizó el método de dializabilidad; asimismo dicho estudio no especifica el tipo de leche utilizada o si fue suplementada con calcio (Soto et al. 2014).

Otro estudio realizado por Ünal et al. (2005) determinaron que la dializabilidad de calcio en leche entera fue de 25.87%, valor mayor al obtenido en esta investigación; esta variación puede explicarse tanto por la diferencia en la procedencia de la leche de vaca entera, como por diferencias en la metodología usada en el análisis, en el estudio de Ünal el pH es modificado a 5 en la fase intestinal y en esta investigación el pH se tituló a un valor de 7; por otro lado ello utilizaron una membrana de diálisis de 12 000

KDa y en nuestro estudio se utilizó una de 6000 a 8000 KDa (Ünal, Nehir y Kilic, 2005).

En una revisión realizada por Fardet et al. (2018) se menciona que la dializabilidad del calcio en la leche entera varía entre 20 a 28%, valor dentro del cual se encuentra el obtenido en la investigación realizada, asimismo en dicha revisión se comparan los valores de absorción de calcio obtenido en estudios en seres humanos concluyendo que la absorción promedio de calcio en la leche de vaca es de 20 a 30%, valores muy similares a los obtenidos por dializabilidad y dentro de los cuales se encuentra el presente estudio, por lo cual se puede mencionar que los datos obtenidos arrojan un valor muy cercano y real de absorción de calcio en la leche.

El valor de dializabilidad se utilizó, en esta investigación, para determinar el aporte potencial que representa la cantidad absorbible, obteniéndose un valor de 20.5 mg/100 ml de leche que representaría el 2% de los requerimientos totales en un adulto.

2.2 Bioaccesibilidad en las muestras líquidas de almendra y ajonjolí

Considerando que no se han realizado estudios de biodisponibilidad en muestras líquidas de fuentes vegetales, la comparación se realizará utilizando estudios realizados en las semillas de ajonjolí, almendras y otros alimentos de origen vegetal. En el caso de la muestra líquida de ajonjolí se obtuvo una dializabilidad de 6.84%, valor superior al obtenido en un estudio realizado en Tailandia donde se analizó la semilla de ajonjolí blanco, el cual reportó un porcentaje de dializabilidad de 4.2% (Kamchan, Puwastein, Sirichakwal y Kongkachichai, 2004). Dicha variación pudo deberse a la diferencia en el procesamiento de las muestras analizadas, y que probablemente afectaron en la cantidad de antinutrientes presentes, en el estudio de Tailandia las semillas fueron tostadas, mientras que en esta investigación se realizó el remojo de las mismas por 8 horas y una posterior molienda y colado. En relación al efecto de las prácticas caseras sobre la biodisponibilidad de nutrientes, Gibson en el año 2007 menciona que el procesamiento térmico puede degradar los fitatos mejorando la biodisponibilidad de minerales, sin embargo dicho efecto es inconsistente ya que ello depende de la temperatura, la especie de planta, pH y tiempo y en el estudio tailandés no se precisa dicha información; por otro lado Gibson refiere que el remojo y la molienda activan las enzimas fitasas favoreciendo la degradación

del ácido fítico y por ende mejorando la biodisponibilidad de minerales. Considerando dicha información se puede inferir que el proceso de remojado y molienda disminuyeron en mayor medida los fitatos del ajonjolí que el tostado y por ello, en esta investigación, arrojó un mayor valor de dializabilidad (Gibson, 2007).

Una revisión realizada por Weaver y Plawecki (1994) estableció que la fracción de absorción del ajonjolí y la almendra fue de 20.8 y 21.2%, respectivamente. Dichos valores, al compararlos con los de las muestras líquidas de esta investigación, son superiores, ello se debe a la diferencia en la metodología aplicada en la valoración, en la del estudio citado en la revisión de Weaver corresponde a una desarrollada en ratas y en estos casos se debe considerar que, dependiendo de la especie, de la actividad enzimática, el estado fisiológico y de la salud de las ratas los valores pueden variar (Farré, 2010) (Caldera, 2012).

Otro estudio realizado por Kafaoglu et al. (2015), en Turquía, determinó que la fracción bioaccesible de calcio en la almendra fue de 6.9%, valor inferior a esta investigación, donde se reportó un porcentaje de dializabilidad de 8.71, diferencia que se puede explicar por la metodología aplicada en la valoración y a la procedencia de la almendra analizada; Kafaoglu en su estudio aplicó un método denominado prueba de extracción basada en fisiología in vitro (PBET), que si bien simula una fase gástrica e intestinal como la aplicada por esta investigación, utiliza componentes químicos diferentes y adiciona una etapa de centrifugación (Kafaoglu, Fisher, Hill y Kara, 2015). Además de ello, la almendra utilizada en la presente investigación es importada de la India, mientras que la del estudio de Kafaoglu es de España, en ese aspecto se debe considerar que el suelo de cultivo puede afectar la composición mineral del alimento y ello genera también una diferencia en la bioaccesibilidad.

Suliburska y Krejpcio, en su investigación realizada el año 2014, evaluaron la biodisponibilidad de calcio en diferentes alimentos, incluyendo nueces de Brasil, cashews, avellanas y nueces; alimentos similares a los analizados en esta investigación, y reportaron que en 100 g de alimento la bioaccesibilidad es de 32.6 %, 6.9%, 15.3% y 5.5 % para las nueces de Brazil, cashews, avellanas y nueces, respectivamente. Comparando dichos resultados con los obtenidos en las muestras líquidas de ajonjolí (6.84%) y almendras (8.71%) se puede mencionar que tanto las nueces de Brasil como las avellanas poseen valores mayores mientras que los cashews y nueces poseen valores inferiores. Dicha diferencia se puede explicar por la diferencia en la matriz alimentaria estudiada y por la variación en el método utilizado, ya que el

presente estudio utilizó la dializabilidad, mientras que el realizado por Suliburska utilizó el método de solubilidad.

Al igual que en el caso de la leche de vaca los valores de dializabilidad se utilizaron para el cálculo del aporte potencial obteniéndose que en 100 ml las muestras líquidas de ajonjolí y almendra se aporta 0.43 mg y 2.15 mg de calcio, respectivamente; que como se observa son mucho menores que el de la leche de vaca.

2.3 Comparación de la bioaccesibilidad de las muestras analizadas

Al comparar la dializabilidad y aporte potencial de las muestras analizadas se puede observar que la leche de vaca presenta mayores valores de dializabilidad y aporte potencial, lo que se traduce en que la biodisponibilidad de calcio en este alimento es mayor. Ello se debe a los diferentes factores que posee la leche de vaca que colaboran con la absorción de calcio dentro de los que se puede mencionar a la presencia de la proteína caseína, que al atravesar una hidrólisis enzimática forma unos compuestos denominados fosfopéptidos, los cuales inhiben la precipitación del fosfato y así mantienen al calcio en su forma soluble; asimismo actúan en la membrana celular del enterocito para incrementar la absorción de este mineral (Perales, Barberá, Lagarda y Farré, 2005). Otro factor a considerar es la presencia de proteínas de suero como la lactoalbúmina, que a nivel *in vitro* ha demostrado tener una acción similar a la calmodulina al unirse fuertemente al calcio y favorecer su absorción; además otro componente a destacar es la lactosa que favorece la absorción de calcio al prolongar el transporte pasivo independiente de vitamina D, asimismo es capaz de aceptar un grupo fosfato y reduce la inhibición de estos sobre la absorción de calcio, otro de los efectos de este azúcar es el incremento de la permeabilidad de la mucosa intestinal por un aumento en el espacio entre las uniones intercelulares (Guéguen y Pointillart, 2013). A diferencia de la leche de vaca en el caso de productos de origen vegetal la presencia de antinutrientes como fitatos, oxalatos, taninos, entre otros son considerados un limitante importante en la absorción de calcio.

En relación a ello se tiene que el ácido oxálico es considerado uno de los inhibidores más importantes de la absorción de calcio al formar complejos insolubles con este mineral (Gibson, Perlas y Hotz, 2006) (Weaver, Heaney, Nickel y Packard, 1997) y se determinó que las bebidas caseras de almendras contienen un valor de 68 mg de

oxalato en 100 ml comparado con el 0.2 mg/100 ml de la leche de vaca (Scholz-Ahrens, Ahrens y Barth, 2019); asimismo en el caso del ajonjolí se reportó un valor de más de 500 mg/100 g de ácido oxálico lo que se correlaciona de forma negativa con la biodisponibilidad de calcio de este alimento. Por otro lado, los fitatos, al igual que los oxalatos, han sido correlacionados con una pobre biodisponibilidad de minerales debido a que a pH fisiológico presenta carga negativa y por ello es capaz de unirse a cationes divalentes (El-Sayed, 2010) y formar complejos insolubles en el intestino impidiendo su digestión y absorción así como favoreciendo su excreción por las heces; dentro de los principales minerales afectados por este antinutriente se encuentra el zinc, calcio, hierro y magnesio (Al Hasan, Hassan, Saha, Islam, Billah e Islam, 2016) (Gibson, 2007). Schlemmer et al. (2009) reportaron en su investigación que las almendras poseen un contenido de fitatos que oscila entre 0.35 – 9.42 g/100 g considerándose como un alimento alto en fitatos al igual que las nueces y las nueces de Brazil; en el caso del ajonjolí, Schlemmer et al. (2009) reportaron un valor que oscila entre 1.44 y 5.36 g/100 g, que al igual que las almendras se consideran como oleaginosas de alto contenido de fitatos; Kamchan et al. (2004) determinaron que las semillas de ajonjolí blanco poseen más de 1000 mg de fitatos en 100 g calificándolo como un alimento con alta concentración de fitatos, ya que se menciona como valor ideal una cantidad menor o igual a 25 mg por 100 g. Asimismo Bello et al. (2013) evaluaron los antinutrientes de la semilla de ajonjolí obteniendo que dicho alimento posee 27.6% de fitatos, valor que supera la cantidad aceptable de 0.03%; en ambos casos dicho contenido de fitatos fue relacionado con una baja biodisponibilidad de calcio.

Considerando la información presentada se puede afirmar que las muestras líquidas de ajonjolí y almendras presentan baja bioaccesibilidad de calcio debido al contenido elevado de fitatos y oxalatos en la materia prima utilizada para la preparación.

Para disminuir el efecto negativo que poseen dichos antinutrientes en la absorción de minerales de importancia nutricional como son el calcio, hierro y zinc se han propuesto diferentes técnicas que reducen su presencia en los alimentos y dentro de ellas se tienen la molienda, depuración, remojo, fermentación, germinación, autoclavado y cocinado (Hendek y Bektaş, 2018). En la investigación realizada se utilizó la técnica de remojo y molienda, técnicas cuyos beneficios han sido estudiados y en relación a ello Hendek y Bektaş mencionan que durante el remojo se produce una activación de la enzima fitasa que reduce el contenido de ácido fítico y puede mejorar la

biodisponibilidad de calcio, hierro y zinc (Hendek y Bektaş, 2018) (Gibson, 2007); asimismo se menciona que el remojo no solo reduce el ácido fítico sino que también reduce el contenido de antinutrientes como las saponinas, oxalatos, polifenoles, entre otros. Asimismo, se menciona que la combinación del remojo con otros tratamientos es mucho más efectiva en la reducción de antinutrientes (Gibson, Perlas y Hotz, 2006). Otra de las técnicas empleadas en la investigación fue la de molienda, en relación a ello se ha determinado que dicha técnica puede reducir el contenido de ácido fítico y de esa manera mejorar la biodisponibilidad de minerales como hierro, zinc y calcio; pese a dichos beneficios una de las desventajas encontradas es que puede generar pérdida de parte de los minerales de dichos alimentos (Hendek y Bektaş, 2018) (Gibson, 2007).

Considerando todo lo mencionado, se puede afirmar que las técnicas utilizadas pudieron reducir la cantidad de ácido fítico en los alimentos estudiados; sin embargo, dichas pérdidas son pequeñas (Gibson, 2007), además no hay bibliografía que evidencie la utilidad de dichas técnicas en la reducción de oxalatos, antinutriente que como se mencionó anteriormente es el principal inhibidor de la biodisponibilidad de calcio.

Otro aspecto importante son los diferentes efectos que se han reportado producto del consumo de este tipo de bebidas vegetales, Miñana et al. (2015) realizaron una revisión bibliográfica de los efectos de bebidas vegetales y reportaron que el consumo de bebida de almendra en lactantes se asoció a alcalosis metabólica grave, hipocloremia, pérdida de potasio por orina, raquitismo grave, hipocalcemia y desnutrición. Vitoria (2017) además de reportar la sintomatología mencionada anteriormente también reportó falla en el crecimiento, kwashiorkor y anemia. Dichas manifestaciones no solo están ligadas a las bebidas vegetales de almendra sino también a otras de origen vegetal por lo que se puede enfatizar en que su consumo en lactantes en reemplazo de la leche de vaca es perjudicial.

CONCLUSIONES:

1. La fracción bioaccesible de calcio de la muestra líquida de ajonjolí fue baja con un 6.84%, valor que representa una cantidad de 0.43 mg/100 ml, el cual cubre un de 0.2% a 0.3% del requerimiento diario de calcio en los diferentes grupos etarios considerando las porciones recomendadas.
2. La fracción bioaccesible de calcio de la muestra líquida de almendra fue de un valor medio, con 8.71% de calcio, valor que representa una cantidad de 2.15 mg/100ml, el cual cubre de 0.8% a 1.3% del requerimiento diario de calcio en los diferentes grupos etarios considerando las porciones recomendadas.
3. La fracción bioaccesible de calcio de la muestra líquida de la leche de vaca fue de un valor alto, con un 20.71% de calcio, valor que representa una cantidad de 20.5 mg/100 ml, el cual cubre un porcentaje de 8% al 14% del requerimiento total de calcio en los diferentes grupos etarios considerando las porciones recomendadas.
4. La leche de vaca posee una bioaccesibilidad mayor de calcio constituyéndose en una fuente importante de este mineral en los diferentes grupos etarios a diferencia de las muestras líquidas de almendras y ajonjolí cuya bioaccesibilidad es baja.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la evaluación de la biodisponibilidad de las muestras líquidas de almendras y ajonjolí utilizando otro tipo de técnicas como Caco-2 o estudios in vivo para contrarrestar los resultados obtenidos con el del método in vitro de dializabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Haro-Vicente, J. y Martínez-Graciá, G. (2006). Optimisation of in vitro measurement of available iron from different fortificants in citric fruit juices. *Food Chemistry*, 98, 638-648. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-af27343e-fd91-3415-ad44-88b1222f64ed>
- Klobukowski, J., Skibniewska, K. y Kowalski, I. (2014). Calcium bioavailability from dairy products and its release from food by in vitro digestion. *Journal of Elementology*, 19(1), 277-288. [10.5601/jelem.2014.19.1.436](https://doi.org/10.5601/jelem.2014.19.1.436)
- Suliburska, J. y Krejpcio, Z. (2014). Evaluation of the content and bioaccessibility of iron, zinc, calcium and magnesium from groats, rice, leguminous grains and nuts. *Journal of food science and technology*, 51 (3), 589-594. [10.1007/s13197-011-0535-5](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0535-5)
- Farré, R. (2015). La leche y los productos lácteos: fuentes dietéticas de calcio. *Nutrición Hospitalaria*, 31(2), 1-9. <http://www.aulamedica.es/nh/pdf/8676.pdf>
- Gallagher, M. (2008). *The nutrients and their metabolism*. En: Mahan K, Escott-Stum (12va ed), Krause's Food and Therapy: Saunders Elsevier.
- Caldera, Y. (2012). *Biodisponibilidad in vitro de hierro y calcio en cereales y derivados* [Tesis de maestría, Universidad de Valencia].
- Binaghi, M., Pellegrino, N. y Valencia, M. (2011). Bioaccesibilidad de minerales en infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St) y en mezclas con leches fortificadas con hierro. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(1), 81-86. https://www.researchgate.net/publication/262475431_Bioaccesibilidad_de_minerales_en_infusiones_de_yerba_mate_Ilex_paraguariensis_St_y_en_mezclas_con_leches_fortificadas_con_hierro
- Etcheverry, P., Grusak, M. y Fleige, L. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc and vitamins B6, B12, D and E. *Frontiers of Physiology*, 3, 1-22.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3429087/>

- Farré R. (2010). Biodisponibilidad mineral: evaluación. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 17 (1), 1-8. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3191671>
- Scholz-Ahrens, K., Ahrens, F. y Barth, C. (2019). Nutritional and health attribute of milk and milk imitations. *European Journal of Nutrition*, 59 (1), 19-34. [10.1007/s00394-019-01936-3](https://doi.org/10.1007/s00394-019-01936-3)
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M. y Farré, R. (2005). Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dializability, and uptake and transport by caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 3721-3726. [10.1021/jf047977y](https://doi.org/10.1021/jf047977y)
- Singhal, S., Baker, R. y Baker, S. (2017). A comparison of the nutritional value of cow's milk and nondairy beverages. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(5), 799-805. [10.1097/MPG.0000000000001380](https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001380)
- López-Luzardo, M. (2009). Las dietas hiperproteicas y sus consecuencias metabólicas. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 22 (2), 95-104. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522009000200007
- Martínez, J., De Arpe, C. y Villarino, A (2012). *Regulación y biodisponibilidad efectiva del calcio. Influencia de la Vitamina D*. En: Avances en alimentación, nutrición y dietética: Nemira, 51-59.
- Weaver, M., Proulx, W. y Heaney R. (1999). Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 543-548. [10.1093/ajcn/70.3.543s](https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.543s)
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2017). *Sésamo*, 307-308. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/sesamo_tcm30-102424.pdf
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (2004). *Cadena Agroindustrial Ajonjolí*, 2-91. <http://repiica.iica.int/docs/B0010e/B0010e.pdf>
- Banco Central de Nicaragua (2004). *Ajonjolí*. Revista de comercio exterior, 1-7.

Fundación Española de Nutrición (2017). *Almendra*, 287-288.

<https://fen.org.es/MercadoAlimentosFEN/pdfs/almendra.pdf>

Zhao, Y., Martin, B. y Weaver, C. (2005). Calcium Bioavailability of Calcium Carbonate Fortified Soymilk is equivalent to cow's milk in young women. *Human Nutrition and Metabolism*, 2379-82. <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2379>

Erfanian, A., Rasti, B. y Manap, Y. (2017). Comparing the calcium bioavailability from two types of nano.sized enriched milk using in-vivo assay. *Food Chemistry*, 606, 6-13.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.116>

Galán, M., Gonzáles, R. y Drago, S. (2013). Perfil nutricional y dializabilidad de minerales de alimentos de interés social. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 17(1), 3-9.

<https://renhyd.org/index.php/renhyd/article/view/2>

Kaushik, R., Sachdeva, B., Arora, S., Kapila, S. y Kaur B. (2014). Bioavailability of vitamin D2 and calcium from fortified milk. *Food Chemistry*, 307-311.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.150>

Binaghi, M. (2014). *Aplicación de un método in vitro para la evaluación de la disponibilidad potencial de minerales en matrices alimentarias diversas. Estimación del aporte potencial de hierro, zinc y calcio en alimentos dirigidos a grupos vulnerables de la población*. [Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio UBA.

http://repositorioubas.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgraafa/index/assoc/HWA_790.dir/790.PDF

Quesada, M. y Henríquez, S. (2011). Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 3(4), 165-182.

<http://revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com/2017/07/11/nutricion-y-osteoporosis-calcio-y-vitamina-d/>

Valencia, F., Román, M. y Cardona, D. (2011). El calcio en el desarrollo de alimentos funcionales. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(1), 104-116.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492011000100012#:~:text=En%20el%20desarrollo%20de%20productos,pero%20precipitan%20en%20los%20envases.

Fernandez, A., Sosa, P., Setton, D., Desantadina, V., Fabeiro, M., Martinez, M., Piazza, N.,

- Casavalle, P., Tonietti, M., Vacarezza, V., De Grandis, S., Granados, N. y Hernández, J. (2011). *Calcio y Nutrición*. Sociedad Argentina de Pediatría.
<https://www.sap.org.ar/docs/calcio.pdf>
- Reyes, M., Gómez-Sánchez, I., Espinoza, C., Bravo, F. y Ganoza, L. (2017). Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. *Instituto Nacional de Salud*.
<https://repositorio.ins.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/INS/1034/tablas-peruanas-QR.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (2009). *Consumo de Alimentos y Bebidas*. INEI.
https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1028/cap01.pdf
- Saravia, D. y Espinoza, G. (2014). *Estudio de pre factibilidad para la producción y comercialización de néctar de ajonjolí en Lima Metropolitana* [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Perú]. Repositorio PUCP.
<https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/5986>
- Febles C. (1998). *Estudio del contenido de fitatos en derivados de cereales de consumo en Canarias* [Tesis doctoral, Universidad de La Laguna]. Repositorio RIULL.
<https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/21232>
- Martínez, B., Ibañez, V. y Rincón, F. (2002). Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52(3).
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000300001
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2017). *Estudio de la Ganadería lechera en el Perú: análisis de su estructura dinámica y propuestas de desarrollo*.
<https://repositorio.midagri.gob.pe/handle/MIDAGRI/73?locale=en>
- Miller, D. D., Schriker, B. R., Rasmussen, R. R., & Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34, 2248–2256. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.10.2248>
- Wolfgor, R., Drago, S., Rodriguez, V., Pellegrino, N. y Valencia, M. (2002). In vitro measurement of available iron in fortified foods. *Food Research International*, 35, 85-90.
https://www.researchgate.net/publication/222998762_In_Vitro_measurement_of_available_iron_in_fortified_foods

- Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Method of Analysis (OMA)* (17th ed.). AOAC International. <https://www.aoac.org/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010). *La alimentación del lactante y del niño pequeño*.
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44310/9789275330944_spa.pdf;jsessionid=7159E11DEEF110ECEFF1762B60CB6791?sequence=1
- Madruza, D. y Pedrón, C. (2020). *Alimentación del adolescente*.
https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/alimentacion_adolescente.pdf
- Instituto Nacional de Salud. (2014). *Requerimientos nutricionales*.
<https://alimentacionsaludable.ins.gob.pe/adolescentes/requerimientos-nutricionales>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). *Necesidades nutricionales*. <https://www.fao.org/3/am401s/am401s03.pdf>
- Roig, M., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. y Lagarda, M. (1999). Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. *Food Chemistry*, 64, 403-409. }
- Soto, A., Morales, P., Haza, A., García, M. y Selgas, M. (2014). Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells. *Food Research International*, 55, 263-270.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996913005863?via%3Dihub>
- Vitoria, I. (2017). The nutritional limitations of plant-based beverages in infancy and childhood. *Nutrición Hospitalaria*, 34(5), 1205-1214.
<https://www.nutricionhospitalaria.org/index.php/articles/00931/show#!>
- Chalupa-Krebsdak, S., Long, C. y Bohrer, B. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, 87, 84-92.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018>
- Kamchan, A., Puwastein, P., Sirichakwal, P. y Kongkachuichai, R. (2004). In vitro calcium bioavailability of vegetables, legumes and seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 311-320. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.03.002>

- Ünal, G., Nehir, S. y Kiliç, S. (2005). In vitro determination of calcium bioavailability of milk, dairy products and infant formulas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(1), 13-22. <https://doi.org/10.1080/09637480500081423>
- Farde, A., Dupont, D., Rioux, LE. y Turgeon, S. (2018). Influence of food structure on dairy protein, lipid and calcium bioavailability: A narrative review of evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(13), 1-39. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1435503>
- Gibson, R. (2007). The role of diet- and host-related factors in nutrient bioavailability and thus in nutrient-based dietary requirement estimates. *Food and Nutrition Bulletin*, 28(1), S77-S100. <https://doi.org/10.1177/15648265070281S108>
- Weaver, C. y Plawecki, K. (1994). Dietary calcium: adequacy of a vegetarian diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5), 1238S-1241S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.5.1238S>
- Kafaoglu, B., Fisher, A., Hill, S. y Kara, D. (2014). Determination and evaluation of element bioaccessibility in some nuts and seeds by in-vitro gastro-intestinal method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 58-65. [10.1016/j.jfca.2015.09.011](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.011)
- Guéguen, L. y Pointillart, A. (2013). The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup2), 119S-136S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718083>
- Gibson, R., Perlas, L. y Hotz, C. (2006). Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65, 160-168. <https://doi.org/10.1079/PNS2006489>
- Weaver, C., Heaney, R., Nickel, K. y Packard, P. (1997). Calcium bioavailability from high oxalate vegetables: Chinese vegetables, sweet potatoes and rhubarb. *Journal of Food Science*, 62(3), 524-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04421.x>
- El-Sayed, H. (2010). Effect of heat treatments on certain antinutrientes and in vitro protein digestibility of peanut and sesame seeds. *Food Science and Technology Research*, 17(1), 31-38. <https://doi.org/10.3136/fstr.17.31>

Al Hasan, S., Hassan, M., Saha, S., Islam, M., Billah, M. y Islam, S. (2016). Dietary phytate intake inhibits the bioavailability of iron and calcium in the diets of pregnant women in rural Bangladesh: a cross-sectional study. *BioMed Central Nutrition*, 2(1), 1-10.

<https://bmcnutr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40795-016-0064-8>

Schlemmer, U., Frolich, W., Prieto, R. y Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: foods sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S330-S375.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.200900099>

Bello, F., Salami-Jaji, J., Sani, I., Abdulhamid, A. y Musa, I. (2013). Evaluation of some anti-nutritional factors in oil-free White sesamum indicum L.Seed Cake. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 4(1), 27-33.

https://www.researchgate.net/publication/326507245_Evaluation_of_Some_Anti-nutritional_Factors_in_Oil-Free_White_Sesamum_indicum_L_Seed_Cake

Hendek, M. y Bektaş, M. (2018). Enhancement of bioavailable micronutrients and reduction of antinutrientes in foods with some processes. *Food and Health*, 4(3), 159-165.

[10.3153/FH18016](https://doi.org/10.3153/FH18016)

Miñana, V., Moreno-Villares, J. & Serra, J. (2015). Errores dietéticos en el lactante: las bebidas vegetales (parte 2). *Acta Pediátrica Española*, 73(9), 229-235.

<https://www.proquest.com/openview/6bc8db530a6a18a719f0b954f5230436/1?pq-origsite=gscholar&cbl=31418>

ANEXOS:**ANEXO 1: Lista de Materiales e Instrumentos a utilizar para el experimento****Materia prima**

- Leche fresca Laive en bolsa de polietileno
- Ajonjolí blanco (Natural Seed)
- Almendras crudas (Frutos y Procesos SAC.)

Materiales e instrumentos:

- Probeta de 100 ml (para medir volumen de remojo) y para preparación de solución de bilis-pancreatina.
- Probeta de 25 ml para preparar pepsina
- Probeta de 50 ml para preparación de otras enzimas
- Vasos de precipitación de 800 ml y 500 ml (para remojo).
- Vaso de precipitación de 800 ml para colocar agua desionizada que sirvió para enjuagar la manguera del espectrofotómetro.
- Cucharita medidora metálica.
- Probeta de 100 ml.
- Tubos de mineralización.
- Recipientes de plástico esterilizados.
- Pipetas de vidrio de 10 ml.
- Pipetas de vidrio de 5 ml.
- Pera de succión.
- Micropipeta
- Membrana de diálisis Spectra/Por® de 6-8 000 KDa de 23 mm; diámetro 14.6 mm y longitud de 30. (Spectrum, CA, USA)
- Microbureta de 2 ml.
- Tubos de ensayo de 20 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Soporte metálico
- Parafilm

Equipos:

- Molinillo eléctrico Decalab 500 GVolt 220.
- Balanza Mettler PC 4400
- Mineralizador
- Baño Termostático

- Licuadora
- Medidor de pH portátil (Denver Instrument UP25)
- Espectrofotómetro de absorción atómica con llama
- Lámparas de Zn, calcio y hierro (Heraeus 37 mm Hollow Cathode Lamp).
- Programa WinLab32 AA Flame.
- Estufa

Enzimas y reactivos:

- Cloruro de lantano
- Hidróxido de sodio (0.10283 N)
- Ácido clorhídrico (6.1119 N)
- Pepsina 1:10000 de origen porcino (Sigma- Aldrich P-7000)
- Extracto biliar porcino (Sigma B-8631)
- Alfa-amilasa de páncreas porcino. Tipo VI-B >10 units/mg solido (Sigma A-3176)
- Pancreatina de páncreas porcino (Sigma-Aldrich P-1750)
- Agua desionizada
- Soluciones estándar de hierro (concentraciones de 2,4,6,8 y 10 ppm)
- Soluciones estándar de zinc (concentraciones de 0.2; 0.4; 0.8; 1.2 y 1.6 ppm)
- Soluciones estándar de calcio (concentraciones de 1,4, 6, 8 y 10 ppm)
- PIPES [piperazine-NN'-bis(2-ethane-sulfonic acid)] disodium salt » 99% (Sigma P-3768)
- Ácido perclórico 70-72% (Merck 100519)
- Ácido nítrico 65% (Merck 101518)

ANEXO 2: FLUJOGRAMA DE METODOLOGÍA

Figura 3. Proceso de Dializabilidad:

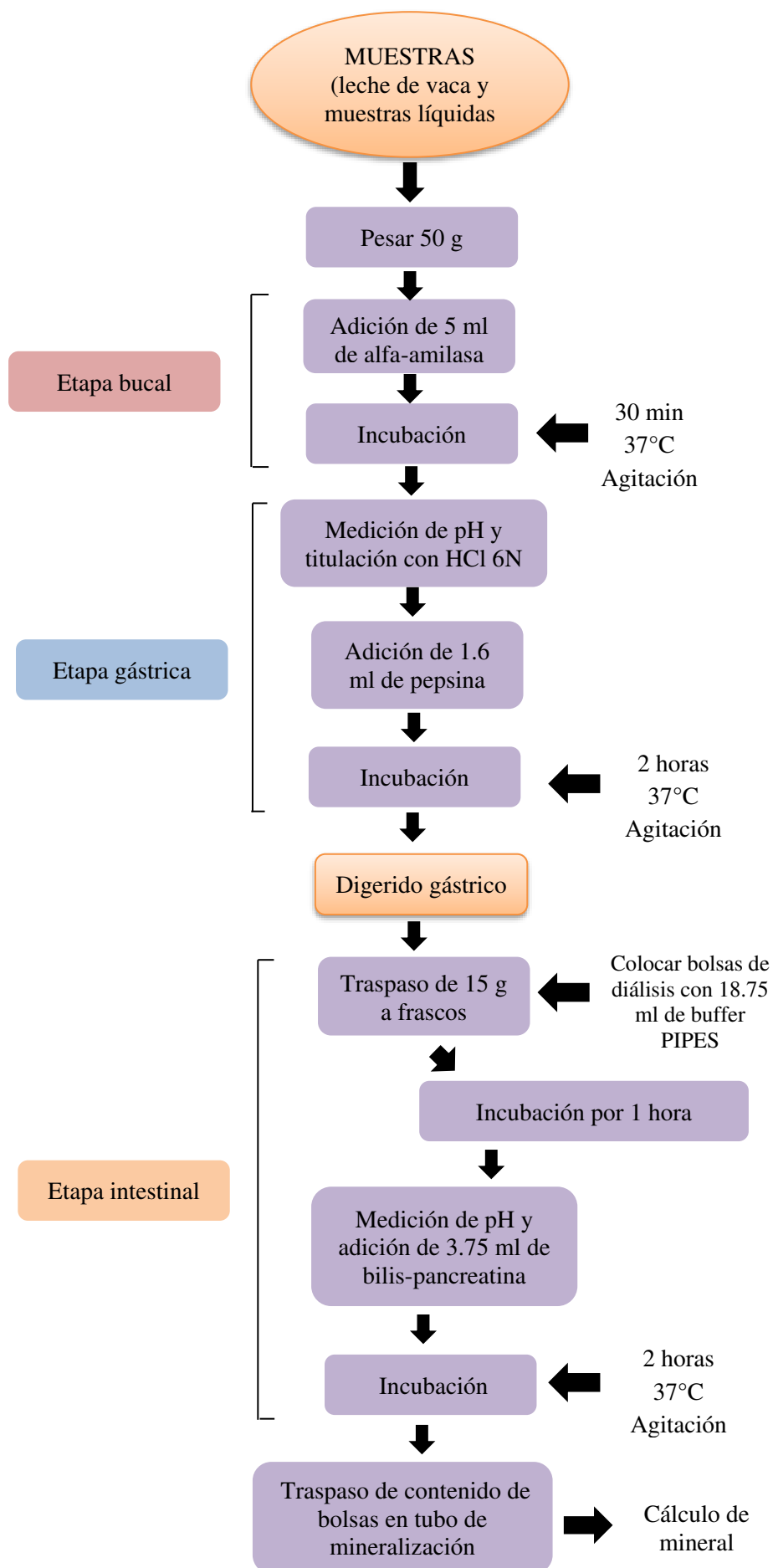


Figura 4. Determinación Mineral