



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estado actual de los métodos de estimación de la bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes alimentos fortificados: una revisión

María Dioselina Fonseca Mendoza

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA
Bogotá, Colombia

2021

Estado actual de los métodos de estimación de la bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes alimentos fortificados: una revisión

María Dioselina Fonseca Mendoza

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora

M. Sc. Olga Patricia Cobos de Rangel

Línea de Investigación:

Diseño y desarrollo de productos alimenticios

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA

Bogotá, Colombia

2021

A Dios por permitirme ser

A mi madre por hacer de mi quien soy

A familia por enseñarme a vivir cada día

Agradecimientos

A Dios, por permitirme seguir mi camino y llevarme todos los días de su mano.

A mi madre y mis hermanos, por creer en mí y apoyarme de manera incondicional.

A Alejandro, por toda su ayuda, paciencia y apoyo para lograr mis metas.

A María Alejandra, José Luis y Ana Sofía por enseñarme, entenderme y animarme para seguir adelante.

A la Profesora Olga Cobos, por compartir conmigo todo su conocimiento y experiencia y especialmente por ser un ejemplo como ser humano.

A mis profesores del ICTA por todas sus enseñanzas en las diferentes áreas, que me permitieron enamorarme cada vez más de mi trabajo.

Resumen

Estado actual de los métodos de estimación de la bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes alimentos fortificados: una revisión

La bioaccesibilidad se define como la fracción de un nutriente o componente bioactivo que está disponible para ser absorbido por el intestino. Es la cantidad real del nutriente que está contenido en un alimento y que puede ser potencialmente aprovechado. La medición de la bioaccesibilidad *in vitro* tiene gran importancia, ya que es una manera relativamente sencilla y práctica de aproximarse al aporte real de nutrientes y componentes bioactivos, teniendo en cuenta que los estudios *in vivo* son costosos y tienen diferentes implicaciones éticas. También, se ha definido la medición de la bioaccesibilidad como un primer paso hacia la estimación de la biodisponibilidad y consecuentemente la bioactividad.

La medición de la bioaccesibilidad se hace a través de la aplicación de digestión simulada, de acuerdo con las distintas fases y condiciones que suceden en el organismo, para lo cual existen diferentes metodologías. Estas metodologías presentan variabilidad en aspectos primordiales como las concentraciones de enzimas, el pH y el tiempo de duración de cada una de las fases. A partir de esta situación, organismos internacionales dedicados a la investigación en la materia, han propuesto protocolos estandarizados, con el fin de definir condiciones más controladas, que permitan la comparación de los resultados de las investigaciones, con conclusiones más consistentes y por ende recomendaciones más específicas.

Por otra parte, teniendo en cuenta los problemas nutricionales que se presentan en la población colombiana, dentro de los que se destaca la deficiencia de hierro y zinc, se plantea una propuesta para medir la bioaccesibilidad de estos minerales en mezclas vegetales, considerando que se han utilizado como vehículo para la fortificación de nutrientes. Se espera que la propuesta sirva como un punto de partida para el desarrollo

de investigaciones futuras al respecto, especialmente en matrices alimentarias de alto consumo y que tienen como objetivo el mejoramiento del estado nutricional de la población.

Palabras clave: (Bioaccesibilidad, hierro, zinc, digestión *in vitro*).

Abstract

Current status of bioaccessibility for *in vitro* estimation methods in iron and zinc for different fortified foods: a review

Bioaccessibility is defined as the fraction of a nutrient or bioactive component available to be absorbed by the intestine. The real amount of the nutrient that is contained in a food and that can be potentially used. The measurement of bioaccessibility *in vitro* is of great importance, since it is a relatively simple and practical way to approach the real contribution of nutrients and bioactive components, considering that *in vivo* studies are expensive and have different ethical implications. Also, the measurement of bioaccessibility has been defined as a first step towards the estimation of bioavailability and consequently bioactivity.

The measurement of bioaccessibility is done through the application of simulated digestion, according to the different phases and conditions that happen in the body, for which there are different methodologies. These methodologies present variability in primary aspects such as enzyme concentrations, pH, and duration of each of the phases. Based on this situation, international organizations dedicated to research in the field, have proposed standardized protocols, to define more controlled conditions, which allow the comparison of the results of the investigations, with more consistent conclusions and therefore more specific recommendations.

On the other hand, considering the nutritional problems that occur in the Colombian population, among which the deficiency of iron and zinc stands out, a proposal is proposed to measure the bioaccessibility of these minerals in vegetable mixtures, considering that they have been used as a vehicle for the fortification of nutrients. It is expected that the proposal will serve as a starting point for the development of future research in this regard,

especially in food matrices of high consumption and that have as objective the improvement of the nutritional status of the population

Keywords: (Bioaccessibility, iron, zinc, *in vitro* digestion)

Contenido

	Pág.
1 Marco Conceptual	3
1.1 Bioaccesibilidad	3
1.1.1 Medición de la Bioaccesibilidad <i>In Vitro</i>	6
1.2 Biodisponibilidad	8
1.3 Bioactividad	9
1.4 Relación conceptual entre biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad	9
1.5 El Proceso Digestivo	10
1.5.1 Etapa Oral	12
1.5.2 Etapa Gástrica	14
1.5.3 Etapa Intestinal	15
1.6 Hierro	19
1.6.1 Compuesto funcional	19
1.6.2 Compuesto de transporte	19
1.6.3 Absorción del hierro	20
1.6.4 Deficiencia de hierro	21
1.6.5 Selección del compuesto de hierro	23
1.7 Zinc	24
1.7.1 Absorción de Zinc	25
1.7.2 Deficiencia de zinc	26
1.7.3 Fortificación con zinc	28
1.7.4 Selección del compuesto de zinc	28
1.7.5 Compuestos que modifican la absorción de Hierro y Zinc	29
2 Objetivos	31
2.1 General	31
2.2 Específicos	31
3 Metodología	33
3.1 Tipo de estudio	33
3.2 Pregunta de investigación	33
3.3 Estrategia de búsqueda	33
3.4 Criterios de elegibilidad de la selección de artículos	34
3.5 Obtención y recopilación de los Datos	34
4 Resultados y Discusión	37
4.1 Resultados de la búsqueda	37
4.2 Variables analizadas reportadas en la literatura científica	38
4.2.1 Matrices alimentarias	40

4.2.2	Tipo de sales empleadas en la fortificación	41
4.2.3	Método de medición de bioaccesibilidad	42
4.2.4	Método estático de digestión <i>in vitro</i> propuesto por consenso internacional..	56
4.3	Discusión de los resultados	62
4.3.1	Fase Oral:	64
4.3.2	Fase gástrica:.....	67
4.3.3	Fase intestinal:	70
4.3.4	Análisis estadístico de los datos.....	76
5	Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de hierro y zinc en mezclas vegetales.....	78
5.1	Estrategias para el control de las carencias de micronutrientes	78
5.2	Alimentos complementarios fortificados en Colombia	79
5.2.1	Prevalencia de deficiencia de hierro y zinc en la población colombiana	80
5.2.2	Mezcla vegetal: La Bienestarina	81
5.3	Propuesta de estimación de la bioaccesibilidad <i>in vitro</i>	87
5.3.1	Preparación preliminar	88
5.3.2	Fase Oral	90
5.3.3	Fase Gástrica	91
5.3.4	Fase Intestinal	92
5.3.5	Medición del contenido de hierro y zinc.....	96
5.3.6	Estimación del porcentaje de bioaccesibilidad.....	97
5.3.7	Variación de digestión intestinal propuesta para colada de Bienestarina.....	97
5.3.8	Análisis estadístico de los datos.....	100
6	Conclusiones y recomendaciones	104
6.1	Conclusiones	104
6.2	Recomendaciones	105
7	Bibliografía.....	109

Lista de figuras

	Pág.
Ilustración 1-1 Definición de biodisponibilidad como suma de bioaccesibilidad y bioactividad.	10
Ilustración 1-2 Esquema del aparato digestivo humano.....	11
Ilustración 1-3 Principales sitios de absorción para cada uno de los nutrientes	16
Ilustración 1-4 Mecanismos de absorción intestinal del hierro	21
Ilustración 1-5 Modelo de la absorción del zinc.....	26
Ilustración 4-1 Identificación de estudios seleccionados para bioaccesibilidad	37
Ilustración 4-2 Esquema de realización de la Digestión <i>In Vitro</i>	59
Ilustración 4-3 Representación gráfica de solubilidad y dializabilidad	74
Ilustración 5-1 Presentación del empaque de Bienestarina.....	86
Ilustración 5-2 Diagrama del proceso para la digestión in vitro de Bienestarina.....	95

Lista de gráficas

Gráfica 4-1 Tipos de matrices utilizadas en los estudios de medición de bioaccesibilidad	40
Gráfica 4-2 Porcentaje de participación de los diferentes tipos de cereales en las matrices alimentarias para medición de bioaccesibilidad	41
Gráfica 4-3 Porcentaje de participación de sales para fortificación de las matrices	41
Gráfica 4-4 Variables aplicadas a las matrices en los estudios de bioaccesibilidad.....	42
Gráfica 4-5 Fases realizadas en los estudios de bioaccesibilidad	45
Gráfica 4-6 Duración de la fase oral de la digestión <i>in vitro</i> en minutos.....	46
Gráfica 4-7 Tiempo de duración de la fase gástrica en horas en los estudios de bioaccesibilidad y distribución porcentual.....	48
Gráfica 4-8 Duración fase intestinal en horas y distribución porcentual.....	50
Gráfica 4-9 pH de la digestión <i>in vitro</i> Fase Intestinal.....	50
Gráfica 4-10 Distribución porcentual del procedimiento utilizado para separación del mineral bioaccesible.....	51
Gráfica 4-11 Métodos de determinación del mineral de interés	52
Gráfica 5-1 Prevalencia de anemia y deficiencia de zinc en población menor de 5 años y mujeres gestantes.....	80
Gráfica 5-2 Prevalencia de anemia por edad en años en población menor de 5 años....	81
Gráfica 5-3 Porcentaje de participación por ingrediente de la Bienestarina	83
Gráfica 5-4 Porcentaje de aporte por porción de Bienestarina en cada uno de los nutrientes de la premezcla	85

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Enzimas que intervienen en la fase oral de la digestión	13
Tabla 1-2 Enzimas que intervienen en la fase gástrica de la digestión.....	15
Tabla 1-3 Enzimas que intervienen en la fase intestinal de la digestión	17
Tabla 1-4 Sintomatología de la anemia	23
Tabla 4-1 Estudios de estimación de bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de hierro y zinc en diferentes matrices alimentarias fortificadas	38
Tabla 4-2 Tratamientos preliminares realizados a las matrices de alimentos preparados	43
Tabla 4-3 Tratamientos preliminares realizados a las matrices de granos crudos/ cocidos	43
Tabla 4-4 Tratamientos preliminares realizados a las matrices de plato mixto	44
Tabla 4-5 Tratamientos preliminares a las matrices de suplementos nutricionales	44
Tabla 4-6 Enzimas utilizadas en la etapa oral para cada uno de los estudios	46
Tabla 4-7 Enzimas utilizadas en la fase gástrica para cada uno de los estudios.....	47
Tabla 4-8 Tiempo de duración de la fase gástrica en cada estudio	48
Tabla 4-9 Características de las enzimas y bilis utilizadas en la fase intestinal en cada uno de los estudios	49
Tabla 4-10 Tiempo de duración de la fase intestinal para cada uno de los estudios	50
Tabla 4-11 Tratamiento estadístico utilizado en los estudios de bioaccesibilidad.....	52
Tabla 4-12 Resultados generales de los estudios de bioaccesibilidad	54
Tabla 4-13 Preparación de soluciones stock de los líquidos de digestión simulada	58
Tabla 5-1 Estrategias para el control de las carencias de micronutrientes	79
Tabla 5-2 Características de los ingredientes utilizados en la fabricación de Bienestarina	82
Tabla 5-3 Aporte nutricional de la Bienestarina el polvo	84
Tabla 5-4 Tabla de factores que inhiben la absorción de hierro	85
Tabla 5-5 Tratamiento preliminar de la muestra antes de la etapa oral	88
Tabla 5-6 Materiales y equipos para estimación de bioaccesibilidad.....	88
Tabla 5-7 Materiales y equipos para estimación de bioaccesibilidad.....	89
Tabla 5-8 Procedimiento Digestión Oral Simulada para Bienestarina	90
Tabla 5-9 Procedimiento Digestión Gástrica Simulada para colada de Bienestarina.....	91
Tabla 5-10 Procedimiento digestión intestinal simulada para colada de Bienestarina	93

Tabla 5-11 Variación propuesta de digestión intestinal simulada para colada de Bienestarina.....	98
Tabla 5-12 Procedimientos de análisis para cada característica de desempeño	102

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
°C	grados Celsius.
Fe	hierro.
Fe+2	hierro (estado de oxidación 2)
Fe+3	hierro (estado de oxidación 3)
g	gramo.
g/dl	gramo por decilitro
g/día	gramo por día.
Kg	kilogramo.
mg	miligramo.
mg/d	miligramo por día.
mg/kg	miligramo por kilogramo.
mg/L	miligramo por litro.
ml	mililitro.

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ENSIN</i>	Encuesta Nacional de Situación Nutricional.
<i>FENALCO</i>	Federación Nacional de Comerciantes.
<i>AOAC</i>	Association of Official Analytical Chemists.
<i>ICBF</i>	Instituto Colombiano de Bienestar Familiar
<i>CORMAF</i>	Comisión Regional de Micronutrientes y Alimentos Fortificados de Centroamérica.
<i>INS</i>	Instituto Nacional de Salud.
<i>ONG</i>	Organización No Gubernamental.
<i>EAR</i>	Requerimiento promedio estimado.
<i>UNICEF</i>	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia.
<i>ICONTEC</i>	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.
<i>NTC</i>	Norma Técnica Colombiana.
<i>INCAP</i>	Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration.
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud.

Introducción

La estimación de la bioaccesibilidad aporta información muy importante para seleccionar la dosis y la fuente adecuada de micronutrientes para matrices alimentarias buscando garantizar la eficacia nutricional de los productos alimenticios (1). Al realizarse la estimación de la bioaccesibilidad es posible tener una aproximación más cercana de la cantidad de un micronutriente que puede llegar a ser absorbido por el intestino para que cumpla con su función dentro del organismo.

Para realizar la estimación de la bioaccesibilidad se tienen disponibles los métodos *in vitro*, los cuales permiten simular en condiciones de laboratorio el proceso de digestión gastrointestinal en sus diferentes fases: boca, estómago e intestino delgado. Posterior al cumplimiento de estos procesos se hace una estimación de la concentración del nutriente en el extracto final (2). El proceso de digestión se simula en condiciones controladas usando las enzimas digestivas comerciales (amilasa, pepsina, lipasa, etc) (3).

En concordancia con lo anterior, se considera la estimación de la bioaccesibilidad como una herramienta importante en el diseño de productos que sirvan como vehículo para el suministro de micronutrientes, especialmente los más críticos para la población colombiana como el hierro y el zinc. Al respecto se ha planteado que la desnutrición por deficiencia de micronutrientes es una situación encontrada en el mundo entero, afectando a múltiples comunidades pero con mayor impacto en las poblaciones más vulnerables, como los menores de 5 años y las mujeres gestantes (4).

Referente a este tema, en Colombia, según la ENSIN 2015, la desnutrición por deficiencia de micronutrientes continúa siendo un problema de salud pública y tiene repercusiones serias en términos de desarrollo económico para las poblaciones afectadas. En los niños de 6 meses a 4 años la prevalencia de anemia es de 24.7%, siendo mayor en los niños y niñas de 6 a 11 meses (62.5%), seguida por los niños de 12 a 24 meses (35.6%), por índice de riqueza, se encontraron prevalencias más altas de anemia en el nivel más bajo (26.8%).

Con respecto al zinc, el 36,0 % de la población entre 1 a 4 años en Colombia presentó deficiencia de este mineral. Se encontraron los mayores porcentajes en niños (sexo masculino) (36,4 %) y en la población sin pertenencia étnica (36,5 %) dentro de este grupo de edad. Aun cuando la prevalencia de deficiencia de zinc ha venido disminuyendo, continúa siendo un grave problema de salud pública (5).

Dentro de las estrategias planteadas para hacer frente a la situación mencionada se encuentra la fortificación de alimentos, como apoyo a otras líneas de acción. En la actualidad se aplican diferentes métodos como la fortificación de alimentos específicos, en donde se utilizan productos para determinados subgrupos de la población, adicionando los nutrientes necesarios. En esta categoría se encuentran los alimentos para lactantes y niños de corta edad, para alimentación escolar, raciones para la alimentación de emergencia y personas desplazadas, entre otros (6).

Teniendo en cuenta la necesidad de la medición del hierro y zinc, dos micronutrientes críticos en la población infantil, potencialmente accesibles en alimentos fortificados y las ventajas de la aplicación de los métodos *in vitro*; se considera de gran utilidad revisar los avances en los métodos de medición con el fin de conocer su aplicabilidad en las mezclas vegetales, debido a que son alimentos utilizados como vehículo para fortificación de nutrientes en poblaciones específicas. Para el caso de Colombia, en los niños menores de cinco años, quienes se consideran población en alto riesgo de desnutrición por el aumento en los requerimientos nutricionales debido al rápido crecimiento y desarrollo (5).

Con el desarrollo del presente trabajo se plantea una propuesta para la estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en mezclas vegetales, las cuales son clasificadas como alimentos complementarios fortificados, obtenidas a partir de la mezcla de harinas de cereales, leguminosas, con adición de vitaminas y minerales.

1 Marco Conceptual

La medición de la bioaccesibilidad se considera como un aspecto clave en el diseño de productos alimenticios que buscan un beneficio para la salud. Específicamente cuando se adicionan uno o varios nutrientes, para disminuir o mejorar los estados de carencia en la población que los va a consumir. La variación en los hábitos alimentarios, las recomendaciones dietarias de organismos internacionales (en las que se tienen en cuenta cada vez más las particularidades de la población), así como la presencia y el conocimiento creciente de gran cantidad de compuestos bioactivos en los alimentos han dado lugar a grandes desafíos para la investigación en nutrición, alimentación y en la industria alimentaria (1).

Es necesario aclarar los conceptos relacionados con los procesos que se llevan a cabo dentro del organismo por parte del nutriente, que se inician con su ingesta y continúan con la digestión, absorción, asimilación y metabolismo. Por ende, se hace alusión a los conceptos de bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad.

1.1 Bioaccesibilidad

La palabra "bioaccesibilidad" es un concepto clave para estimar la eficiencia nutricional tanto de los alimentos en su forma natural, como de los productos alimenticios desarrollados para contribuir a mejorar la salud humana. Es por esto que se ha definido como la fracción de una sustancia que se convierte en disponible para ser absorbida, al ser liberada en el tracto gastrointestinal a través de los mecanismos específicos adecuados (1).

La bioaccesibilidad está estrechamente ligada y puede diferir en gran medida con la concentración total en la matriz alimentaria (7), relacionada con la capacidad de los nutrientes de ser solubilizados y posteriormente ser liberados al medio (7). Para varios

autores la bioaccesibilidad se considera como sinónimo de solubilidad. La bioaccesibilidad es, en consecuencia, la relación de la cantidad de una sustancia potencialmente disponible para el aprovechamiento y absorción dentro del intestino (8).

En general la bioaccesibilidad incluye la secuencia completa de eventos que ocurren durante el proceso digestivo de los alimentos en sustancias más simples, asimilables por el organismo, incluyendo la absorción en los enterocitos y el metabolismo presistémico (intestinal y hepático) (1). Es muy importante considerar que el contenido bioaccesible es siempre igual o superior al contenido biodisponible. También se ha definido el término bioaccesibilidad como la cantidad del micronutriente objetivo liberado de la matriz alimentaria por la digestión normal y solubilizado en el tracto gastrointestinal, quedando así "disponible" para la absorción por las células intestinales (2). En la misma línea, los métodos de bioaccesibilidad / biodisponibilidad *in vitro* proporcionan un conocimiento profundo sobre las interacciones entre los nutrientes y sus componentes alimentarios, el efecto del pH y las enzimas, las prácticas de preparación y procesamiento de alimentos sobre la capacidad de absorción de micronutrientes. Por lo tanto, el conocimiento de la bioaccesibilidad es importante para establecer la calidad de un nutriente (9).

Otros autores la definen como la fracción de un componente ingerido que se vuelve accesible para la absorción a través de la capa epitelial del tracto gastrointestinal. Para ser absorbidos, los componentes deben inicialmente ser liberados de la matriz alimentaria y luego ser solubilizados en micelas; por lo tanto, la determinación experimental de la bioaccesibilidad logra buenos resultados con el uso de métodos *in vitro*, resaltando que la clave de estas estimaciones es la realización de una simulación lo más apegada posible a la realidad, en cuanto a las condiciones químicas, bioquímicas y mecánicas en cada una de las fases. La bioaccesibilidad finalmente se reporta en porcentaje definiéndose como la relación entre la cantidad de un componente solubilizado y la cantidad de componente en crudo digerido (10).

En una visión más amplia se ha planteado que durante todo el proceso que sufre la matriz alimentaria hasta llegar a ser consumida, puede tener transformaciones que influyen directamente en la bioaccesibilidad de los diferentes nutrientes y que es posible mitigar los efectos negativos que puedan sucederse mediante acciones concretas que vayan de acuerdo con la matriz y con el nutriente de interés (11). Los pasos iniciales están

condicionados por los parámetros fisicoquímicos de los ingredientes y la microestructura del alimento; posteriormente es la bioquímica y la fisiología las que juegan un papel más importante. El tipo de procesamiento que sufre la materia prima: tostado, molienda; el tipo de nutriente a considerar: sensible o no al calor, ácidos o álcalis; la composición y estructura de la matriz, presencia de estructuras como fibras que interfieren en la absorción de los nutrientes, juegan un papel importante en la bioaccesibilidad de los mismos. Este factor se ve afectado por la composición bioquímica de la matriz alimentaria y por las sinergias y antagonismos que se puedan establecer entre los diferentes componentes (2) (12).

Complementando el concepto, también se ha definido que existen factores que afectan la bioaccesibilidad como los elementos estructurales de la matriz alimentaria, como paredes celulares, gránulos de almidón y cuerpos de proteína en los granos de cereales. Otros factores con algún tipo de incidencia pueden ser: la forma química de los minerales y otros nutrientes, ya que estos pueden encontrarse dentro de la matriz en la forma química como se absorbe o como un precursor requiriendo activación o paso previo. Además pueden suceder interacciones de la matriz con potenciadores o cofactores, los cuales pueden actuar de formas diferentes, manteniendo el nutriente soluble o protegiéndolo de la acción de los inhibidores; la interacción con inhibidores o supresores puede reducir la biodisponibilidad de los nutrientes: al volverlo insoluble e impedir su absorción o al competir por la misma vía de utilización (11).

También se ha planteado haciendo alusión más específica al tema, que la bioaccesibilidad de los minerales en una matriz alimentaria depende de varios factores, como la composición de esta (el equilibrio entre los componentes de absorción, promotores e inhibidores), los aditivos y los métodos de procesamiento. Los principales componentes inhibidores en una matriz alimentaria incluyen ácido fítico, taninos, ácido oxálico y fibra dietética, y también depende del contenido de proteínas, la composición y la interacción general de los componentes en la matriz (13).

Se ha observado adicionalmente, la proliferación de estudios relacionados con digestión *in vitro* y bioaccesibilidad orientados, por ejemplo, a evaluar la relación que existe entre el consumo de alimentos antioxidantes, probióticos y fibras con la promoción de salud y al interés que estos temas están suscitando en los consumidores, frente a la prevención de

la aparición de enfermedades no transmisibles como obesidad, cáncer, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares con una importante carga de mortalidad a nivel mundial (14).

1.1.1 Medición de la Bioaccesibilidad *In Vitro*

Para determinar la bioaccesibilidad se cuenta con diferentes modelos metodológicos, *in vitro*, que permiten reconocer, la cantidad de micronutrientes que estarían disponibles para ser absorbidos y por lo tanto en condiciones de ser utilizados, en ciertos casos con gran precisión. Se han desarrollado varios métodos *in vitro*, en las últimas dos o tres décadas, para simular las condiciones fisiológicas (temperatura, agitación, pH, enzima y composición química) y las secuencias de eventos que ocurren en el tracto gastrointestinal humano en la digestión. Estos métodos llamados estáticos o bioquímicos son las técnicas más simples y por lo tanto más fácilmente reproducibles incluyendo dos o tres etapas de digestión (oral, gástrica e intestinal) cuyos productos permanecen inmóviles en un solo biorreactor (15).

La digestión *in vitro* se fundamenta en los conocimientos actuales de la fisiología humana sobre el funcionamiento del aparato digestivo, extrapolados a las condiciones del laboratorio, para crear protocolos adecuados para llevar a cabo los ensayos. Sin embargo, no todos los eventos que ocurren durante el proceso digestivo pueden ser reproducibles mediante estos ensayos y una de las mayores desventajas del método es que no incluye las interacciones complejas entre el alimento y el organismo (14).

Al respecto, se han desarrollado varios trabajos de investigación como el de Hoebler y otros, quienes diseñaron un sistema de digestión *in vitro* en el que se imitaban los procesos físicos y químicos de la boca y el estómago para entender la cinética de la digestión de los hidratos de carbono y proteínas en pan. Para simular la digestión en fase oral, el pan se molió y se sometió a la acción de la amilasa, midiendo la liberación de oligosacáridos (8).

Miller describió un método *in vitro* para la estimación de la disponibilidad de hierro de alimentos el cual implica la digestión gastrointestinal simulada, seguida por la medición de hierro soluble de bajo peso molecular. Las mezclas de alimentos se homogeneizaron y se expusieron a pepsina a pH 2. La digestión se continuó después de la adición de sales

biliares y pancreatina. El hierro de la mezcla de digestión fue difundido a través de una membrana semipermeable. Los resultados fueron similares cuando se midió el hierro de alimentos de origen intrínseco o extrínseco. Se realizaron estimaciones de disponibilidad en alimentos fortificados para conocer la disponibilidad de hierro y la mejora de los factores de inhibición. Pudo observarse que las disponibilidades relativas eran determinadas por el contenido de ácido ascórbico, además de la presencia de otros alimentos como los huevos, zumo de naranja, té, café, refrescos de cola, o panes de diferentes tipos, el método refleja de manera adecuada la disponibilidad de hierro real de alimentos (16).

Los métodos de digestión simulados generalmente incluyen las tres etapas, como se mencionó anteriormente, observándose que la mayoría de los modelos reportados en la literatura son estáticos, es decir, modelos con proporciones constantes de alimento enzimas, sales, ácidos biliares, etc. en cada paso de la digestión (3).

En otro estudio, los porcentajes de hierro ferroso y dializable, fueron estudiados en un jugo cítrico (piña y maracuyá) fortificado con sulfato ferroso, pirofosfato férrico micronizado dispersable y bis-glicinato ferroso en concentraciones similares. El método *in vitro* de Kapsokefalou y Miller, se aplicó utilizando 0,15 N de soluciones tampón (pH 8,5), para ajustar el pH durante la digestión pancreática. También se estudiaron diferentes valores de pH de soluciones tampón utilizando en la medición las concentraciones de hierro con ferrozina (solución cromógeno). Las absorbancias máximas se obtuvieron con un valor de pH de 8,5 de solución tampón. El sulfato ferroso se utilizó como una sal de referencia, aunque nuevos compuestos, como bis-glicinato ferroso y férrico y pirofosfato micronizado dispersarle, mostraron una alta disponibilidad de hierro relativa en jugo (17).

Cagnasso en el año 2010, utilizó la dializabilidad de los minerales (D%) como un indicador de la biodisponibilidad potencial. El procedimiento involucra una digestión enzimática en condiciones que simulan las fisiológicas. Cada muestra fue homogeneizada en una procesadora para facilitar su posterior análisis. Alícuotas de 15 g de cereales procesados se incubaron con solución acuosa al 3% de μ E-amilasa y 45 ml de agua o leche durante 30 minutos a 37° C con agitación. El contenido total de minerales de las muestras fue determinado en el digerido de pepsina por espectroscopia de absorción atómica, previa mineralización con una mezcla HNO₃ -HClO₄ (50:50). La dializabilidad mineral se calculó

como el porcentaje del mineral dializado con respecto a la concentración total de mineral presente en cada muestra (18).

Chu y Beauchemin describieron la metodología para evaluar la bioaccesibilidad máxima de nutrientes liberados de los alimentos en los fluidos gastrointestinales artificiales (saliva, jugo gástrico, y jugo intestinal) con inyección de flujo y acoplada, con espectrometría de masas. Posteriormente Haro-Vicente y otros (17) utilizaron digestión *in vitro* para medir el hierro disponible de diferentes fortificantes (sulfato ferroso, pirofosfato férrico micronizado dispersables y ferroso bis-glicinato) en zumos de frutas cítricas.

1.2 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se puede definir como la fracción del nutriente que se ingiere y que está disponible para ser utilizado en funciones fisiológicas o para ser almacenado por el organismo según corresponda. Por lo tanto, la biodisponibilidad de una sustancia comprende la liberación desde la matriz alimentaria y la disponibilidad asociada para la absorción como tal, el metabolismo, la distribución hacia los tejidos y la bioactividad (1).

La biodisponibilidad, también puede ser definida como la eficiencia con la cual, las sustancias nutritivas de la dieta son utilizadas biológicamente. Depende del tipo de compuesto presente en los alimentos, la combinación de diferentes sustancias en un mismo tiempo de comida, la cantidad, el estado nutricional del individuo y de algunos eventos especiales para los cuales el organismo crea mecanismos de adaptación, bien sea por movilización entre los tejidos o su variación en la absorción. Para el caso del hierro, por ejemplo, la absorción se eleva en caso de deficiencia, las anemias hemolíticas y en la hipoxia, mientras que en procesos inflamatorios o infecciosos existe una reducción de la misma (19).

Como representación de los múltiples factores que pueden intervenir en la biodisponibilidad del hierro, se ha observado, por ejemplo, que a pesar del alto contenido de hierro no hem de los alimentos, su biodisponibilidad varía desde menos del 1% hasta un 20%. Debido a que otros nutrientes de la dieta pueden aumentar o disminuir la eficiencia con la cual son solubilizados y/o reducidos por el pH gástrico, influyendo de manera importante en su absorción. La combinación de varios factores o inclusive sólo uno de ellos

hace que algunos compuestos cobren importancia como estimuladores o como inhibidores de la biodisponibilidad del mineral (20).

1.3 Bioactividad

El concepto de bioactividad encierra los diferentes fenómenos que ocurren después de que un nutriente llega a la circulación sistémica. Lo que incluye transporte a los tejidos específicos, reacción con biomoléculas, metabolismo dentro de estos tejidos y toda la secuencia de resultados fisiológicos que se derivan del proceso, generando también la producción de un biomarcador y la respuesta fisiológica que provoca. Por tanto, las mediciones de bioactividad están basadas especialmente en los eventos que suceden mientras que el nutriente interactúa con las biomoléculas propias y específicas, dando lugar a un metabolito, una señal o una respuesta, que tendrá diferentes variaciones hasta que suceda la respuesta fisiológica sistémica, la cual traerá el beneficio para la salud esperado. Las declaraciones sobre beneficios específicos de un nutriente (propiedades saludables o disminución del riesgo de enfermedad) se basan en desarrollo de estudios de bioactividad (2).

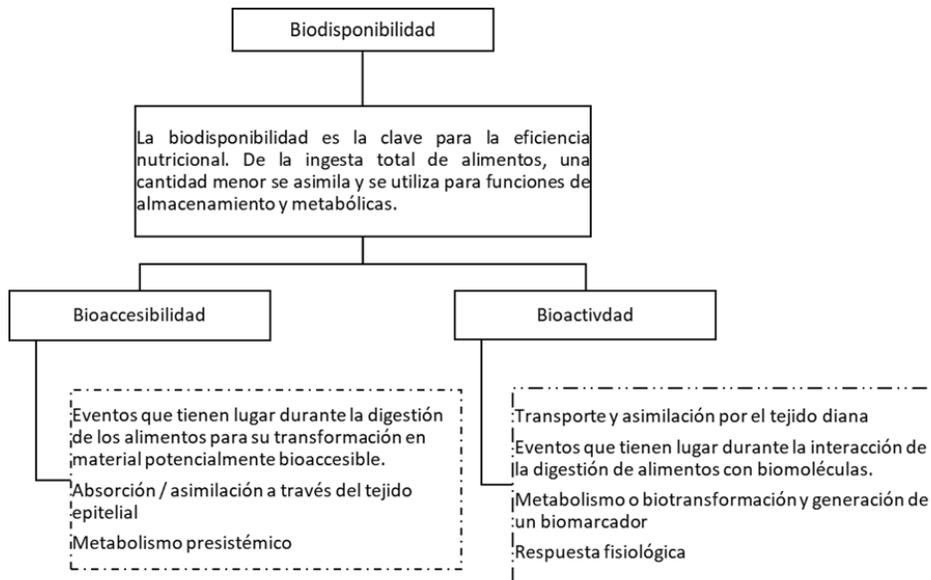
Presentando la definición básica de cada uno de estos elementos revisados, se incluye el contexto en el que se relacionan, con el fin de interpretar las dependencias entre cada uno de ellos.

1.4 Relación conceptual entre biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad

Fernández-García realizó una propuesta para la definición de estos conceptos, en la que plantea la relación existente entre ellos. Se define la biodisponibilidad como la cantidad del nutriente que se asimila y utiliza para diferentes funciones metabólicas o de almacenamiento; la bioaccesibilidad es la fracción de un compuesto que se libera de su matriz en el tracto gastrointestinal y está disponible para la absorción; la bioactividad se relaciona con la forma en que el compuesto bioactivo se transporta y alcanza el tejido diana, su interacción con las biomoléculas, el metabolismo o biotransformación que puede sufrir y la producción de un biomarcador, así como la respuesta fisiológica que provoca. Se ha observado que los términos de biodisponibilidad y la bioaccesibilidad se utilizan indistintamente con frecuencia, sin embargo, es importante aclarar que dentro de la

definición de biodisponibilidad se incluye la bioactividad, es decir la “biodisponibilidad” incluye disponibilidad para absorción, la absorción en sí misma, el metabolismo del nutriente, la distribución dentro de los tejidos específicos y la bioactividad (1). (Ilustración 1-1)

Ilustración 1-1 Definición de biodisponibilidad como suma de bioaccesibilidad y bioactividad.



Fuente: Fernández-García (1)

Como puede observarse la biodisponibilidad no solamente abarca como tal la capacidad de un nutriente de ser absorbido y transformado en sustancias potencialmente aprovechables por el organismo, sino que también incluye la forma en que el nutriente es transportado al tejido diana, así como los mecanismos mediante los cuales se generan los cambios y las respuestas fisiológicas que en conclusión serían los efectos en la salud que se buscan con la utilización del mencionado nutriente (1).

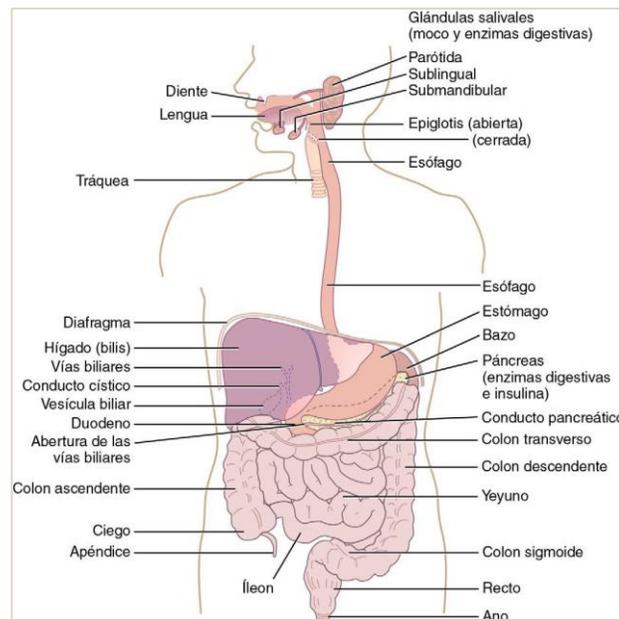
1.5 El proceso digestivo

Para llevar a cabo los estudios de bioaccesibilidad es necesario reproducir el proceso digestivo humano, mediante un modelo estático *in vitro*. Por lo tanto, se realiza una breve revisión del mencionado proceso, con el fin de considerar su secuencia dentro del organismo. La digestión comienza en la cavidad oral, el procesamiento del alimento se produce a todo lo largo del tubo digestivo; éste proceso involucra la formación y

degradación del bolo, absorción de los componentes disponibles y la eliminación de los restos no digeribles (21).

El tubo digestivo humano es adecuado tanto para la digestión, como para la absorción de los nutrientes en diferentes tipos de alimentos: lácteos, carnes, frutas, leguminosas, verduras, cereales, azúcares, almidones complejos, grasas y aceites. Tanto los macro como los micronutrientes indispensables para la vida vienen de los alimentos de la dieta, a través de los mencionados procesos de digestión y absorción (22). A continuación, se muestra el esquema del aparato digestivo humano (Ilustración 1- 2).

Ilustración 1-2 Esquema del aparato digestivo humano



Fuente Krause (22)

Dentro de los elementos claves en la digestión están las enzimas, que se definen como polímeros biológicos que catalizan las reacciones químicas, necesarias para la vida. Las enzimas en la digestión son las encargadas, de acuerdo con la especificidad de cada una de ellas de la hidrólisis en el alimento. La existencia y continuidad de un conjunto permanente, equilibrado y completo de enzimas es imprescindible para el metabolismo de los nutrientes a fin de que proporcionen energía para la motilidad celular, la función neural y la contracción muscular, además de compuestos químicos para la formación de proteínas, DNA, membranas, células y tejidos (23). Las enzimas digestivas se sintetizan

en células especializadas en la boca, estómago, páncreas e intestino delgado. Algunas enzimas se unen a sus sustratos cuando entran en la célula y están localizadas en las membranas de lipoproteínas de las células mucosas (22).

La bilis, el bicarbonato de sodio y el ácido clorhídrico son cofactores, que favorecen los procesos de digestión y absorción. Excepto en el caso de la fibra y de algunos hidratos de carbono la digestión y la absorción se realizan usualmente por completo en el intestino delgado (22).

A continuación, se revisa cada una de las fases de la digestión, incluyendo tanto el lugar del sistema digestivo en donde se realiza, como los compuestos químicos que intervienen.

1.5.1 Etapa oral

Gracias a las características de la boca, se realiza allí la primera etapa del proceso digestivo. Mediante la masticación se reduce el tamaño de las partículas del alimento, para que posteriormente se mezclen con las secreciones salivales. El esófago es un delgado tubo muscular, incrustado en el tejido conectivo laxo en el mediastino posterior. Está rodeado por importantes estructuras, como el corazón, la aorta y la tráquea (24). Tiene aproximadamente 25 cm de largo, dividiéndose en tres zonas: el esfínter esofágico superior, el cuerpo esofágico y el esfínter esofágico inferior (EEI) o cardias. El esófago transporta alimentos y líquidos desde la cavidad oral y la faringe hasta el estómago (25).

El medio en el que encuentran todas las sustancias que hacen parte de la etapa oral de la digestión es la saliva, esta se produce por las glándulas salivales, y es enviada a la cavidad bucal. Proviene en su mayoría de glándulas salivales mayores, 93 % y de las menores en 7%. Tanto por sus funciones como por su composición, se considera una secreción bastante compleja (26). La saliva contiene una gran variedad de electrolitos dentro de los que se destacan sodio, potasio, fosfatos, magnesio, calcio y bicarbonato. Además, incluye inmunoglobulinas, enzimas, proteínas, mucinas y productos nitrogenados, como urea y amoníaco. Tanto el bicarbonato como los fosfatos y la urea pueden modular el pH y por lo tanto la capacidad amortiguadora de la saliva (27).

Dentro de las importantes funciones de la saliva, se destaca la de proteger y mantener con la lubricación la mucosa de la parte superior del tracto digestivo; el mantenimiento de la integridad de los dientes, la acción amortiguadora y de limpieza en estas estructuras; actividad antibacteriana y antiviral, remineralización, la percepción del sabor, masticación, producción del bolo alimenticio, deglución y digestión (28). Las mucinas presentes en la saliva sirven para limpiar, agregar y/o unir microorganismos orales y aportar en el metabolismo de la placa dental; el calcio, el fosfato y las proteínas conforman un factor antisolubilidad; y las inmunoglobulinas y enzimas suministran acción antibacteriana (27).

El complejo proceso de la masticación está determinado por factores como la cantidad de comida que se ingiere, la composición de los alimentos, el número de ciclos de masticación, la fuerza de mordida, el estado de los dientes, el grado de hambre y los hábitos alimentarios entre otros (29).

- Enzimas de la etapa oral

Al comienzo del proceso digestivo, la principal enzima de la saliva es la alfa-amilasa: su función es la digestión bucal del almidón de los alimentos. Cataliza la ruptura de los enlaces polimerizantes alfa (1-4) , desempeñando un papel fundamental en la nutrición (26). Para una adecuada actividad la α -amilasa salival (ptialina), necesita un pH de 6.8 aproximadamente. Su actividad está limitada a la cavidad bucal en donde el pH puede ser alto por la capacidad tampón de los alimentos. La acción esta enzima disminuye en la etapa gástrica temprana debido al medio ácido y la actividad proteolítica en el estómago. Por lo anterior, se considera que tiene una menor importancia frente a la α -amilasa pancreática (3). A continuación, se relacionan las enzimas de la etapa oral (tabla 1-1).

Tabla 1-1 Enzimas que intervienen en la fase oral de la digestión

Secreción y origen	Enzimas	Sustrato	Acción y productos resultantes
Saliva de las glándulas salivales de la boca	Ptialina (amilasa salival)	Almidón	Hidrólisis para formar dextrinas y oligosacáridos ramificados

Adaptado de Mahan LK (22)

1.5.2 Etapa gástrica

Respecto a la función del estómago, su principal propósito es el de entregar su contenido de forma regulada al duodeno para realizar la digestión intestinal. En el antro (parte inferior del estómago), se mezcla el alimento y es digerido con las enzimas secretadas y el ácido clorhídrico, molido por los movimientos antrales y poco a poco vaciado en el duodeno (15).

Distintos tipos de células pueden encontrarse dentro del estómago, con proliferación bidireccional de las células del cuello de las glándulas gástricas. Las células producen factor intrínseco para la absorción de la vitamina B12 y HCl como parte fundamental del jugo gástrico. Las células principales producen zimógeno y pepsina, mientras que enteroendocrinas producen serotonina, gastrina, grelina, somatostatina, endotelina, histamina y enteroglucagón entre otras. Las células mucosas producen bicarbonato y una capa protectora en la superficie celular (30). Por medio de las contracciones de la zona antral, los alimentos se licúan y mezclan generando una formación homogénea de moco y jugo gástrico, dando como resultado una sustancia semilíquida que recibe el nombre de quimo. Esta sustancia sale del estómago lentamente y de manera gradual, de acuerdo con la relajación del píloro (25).

- Enzimas de la etapa gástrica

La pepsina es la primera enzima que actúa sobre las proteínas, especialmente en la zona media de las cadenas peptídicas, en los enlaces hidrófobos en los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, presentes en la gran mayoría de las proteínas alimentarias. Es la única enzima proteolítica en el estómago, el pepsinógeno es su precursor inactivo, el cual es transformado en pepsina activa por el ácido clorhídrico (31). El contenido de pepsina en el estómago varía con las personas, sin embargo, aumenta principalmente en la digestión de 0,26 (30 min) a 0,58 mg/ mL (180 min) (32).

En cuanto a las grasas, la mayoría de los ácidos grasos provenientes de la dieta son consumidos como triglicéridos y su aprovechamiento depende de la hidrólisis de los enlaces éster y del glicerol (33). La lipasa gástrica tiene como función catalizar la hidrólisis de los triglicéridos, liberando gliceroles, diglicéridos o gliceroles. Al hidrolizar las uniones de los esteres de los triglicéridos, permiten que los subproductos sean más solubles en un medio acuoso. La lipasa gástrica tiene mayor especificidad para los triglicéridos de ácidos

grasos de cadena media y corta. La lipasa secretada hacia el estómago por las células principales es menos activa que la lipasa pancreática, sin embargo, es más estable en medio ácido (22). Diferentes factores afectan las tasas de lipólisis y el suministro de ácidos grasos al organismo, como los niveles de lipasa en el tracto digestivo, polimorfismo y estructura de la lipasa, así como la existencia de potenciadores o inhibidores (33). Las enzimas de la etapa gástrica se relacionan a continuación (Tabla 1-2).

Tabla 1-2 Enzimas que intervienen en la fase gástrica de la digestión

Secreción y origen	Enzimas	Sustrato	Acción y productos resultantes
Jugo gástrico de las glándulas gástricas de la mucosa del estómago	Pepsina	Proteínas (en presencia de ácido clorhídrico)	Hidrólisis de los enlaces peptídicos para formar polipéptidos
	Lipasa gástrica	Grasa, especialmente de cadena corta	Hidrólisis para formar gliceroles,

Adaptado de Mahan LK (22)

1.5.3 Etapa intestinal

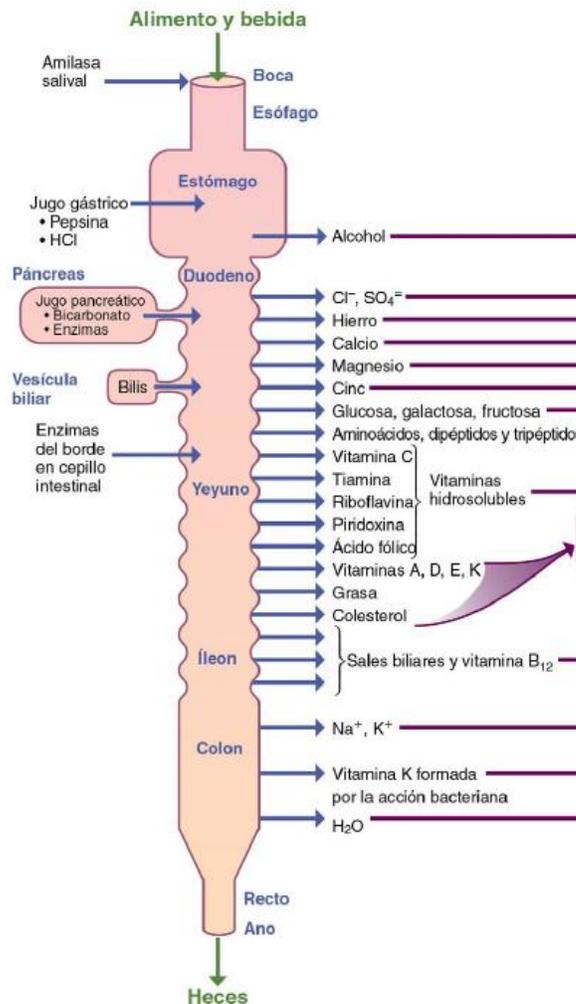
La primera parte del intestino delgado es el duodeno, que se extiende desde el esfínter pilórico hasta el ángulo de Treitz, con unos 25-30 cm aproximadamente. El resto del intestino delgado está conformado por las asas de yeyuno e íleon. El íleon se une al colon a través de la válvula ileocecal (25).

En toda la superficie restante del intestino delgado, se absorben la gran mayoría de los macronutrientes, oligoelementos, vitaminas, minerales y líquidos antes de alcanzar el colon. El colon y el recto absorben casi todo el líquido restante procedente del intestino delgado, electrólitos y una pequeña cantidad de otros nutrientes. Si se suman las secreciones salivales y gástricas, pancreáticas, del intestino delgado y vesícula biliar, se alcanzarían de 7 a 9 litros de líquido al día, equivalente a tres o cuatro veces más líquido del que se ingiere por vía oral regularmente. Toda esta cantidad se reabsorbe exceptuando de 100 a 150 ml aproximadamente del líquido total que entra en la luz intestinal (22).

Parte de los nutrientes que son absorbidos por el tubo digestivo llegan por vía porta hasta el hígado, en donde siguen diferentes rutas, como transformarse en otras moléculas, ser almacenados, o liberados al torrente sanguíneo. Los productos finales de la digestión de

las grasas alimentarias se transportan hacia el torrente circulatorio vía circulación linfática. Otros elementos, dentro de los que se incluye la fibra, el almidón resistente, algunos azúcares y aminoácidos se fermentan en el borde de cepillo del colon, lo que les permite servir como material prebiótico (34). Este material prebiótico promueve y facilita la relación simbiótica entre el tubo digestivo y su microflora (35). La ilustración siguiente contiene los principales sitios de absorción por cada uno de los nutrientes. (Ilustración 1-3)

Ilustración 1-3 Principales sitios de absorción para cada uno de los nutrientes



Fuente Krause (22)

- Enzimas de la etapa intestinal

En el intestino delgado tiene lugar la verdadera transformación de los alimentos en sustancias elementales aptas para ser absorbidas, y para ello son fundamentales la bilis y

el jugo pancreático, el cual contiene la amilasa, lipasa y tripsina, y el propio jugo intestinal secretado por sus células (36)

El páncreas produce enzimas que digieren los nutrientes principales y las enzimas del intestino delgado colaboran para concluir este proceso. Las enzimas que se encuentran en el borde en cepillo del intestino delgado reducen aún más los carbohidratos a monosacáridos y los péptidos a aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos (34).

La lipasa pancreática se secreta hacia el intestino delgado y requiere para activarse de otra proteína pancreática, la colipasa. Estas actúan en la digestión de los lípidos, específicamente en los enlaces éster primarios, o sea enlaces 1 y 3, generando 2-monoacilgliceroles y ácidos grasos libres, que son productos terminales de la digestión de triacilglicerol a nivel luminal (23).

Por otro lado, dentro de las enzimas que actúan en la digestión de las proteínas están: la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa, aminopeptidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa. Las dos primeras son secretadas en sus formas inactivas, y son activadas por la enterocinasa o enteropeptidasa, en el momento en que el quimo hace contacto con la mucosa del intestino. La tripsina es una endopeptidasa que hidroliza las uniones peptídicas del grupo carboxilo de lisina y arginina, generando, polipéptidos que contienen lisina terminal y grupos arginina (31).

La amilasa pancreática hidroliza moléculas grandes de almidón, llegando a estructuras entre dos a seis azúcares. El borde en cepillo de las vellosidades intestinales cuentan con enzimas que se encargan de hidrólisis adicional de carbohidratos llegando a monosacáridos previo a su absorción (22) (Tabla 1-3).

Tabla 1-3 Enzimas que intervienen en la fase intestinal de la digestión

Secreción y origen	Enzimas	Sustrato	Acción y productos resultantes
	Lipasa	Grasa (en presencia de sales biliares)	Hidrólisis formando monoglicéridos y ácidos grasos; que se incorporan a las micelas
	Colesterol esterasa	Colesterol	Hidrólisis formando monoglicéridos y ácidos

Secreción y origen	Enzimas	Sustrato	Acción y productos resultantes
Secreciones exocrinas del páncreas			grasos; que se incorporan a las micelas
	a-amilasa	Almidón y dextrinas	Hidrólisis formando dextrinas y maltosa
	Tripsina (tripsinógeno activado)	Proteínas y polipéptidos	Hidrólisis de los enlaces peptídicos internos formando polipéptidos
	Quimotripsina (quimotripsinógeno activado)	Proteínas y péptidos	Hidrólisis de los enlaces peptídicos internos formando polipéptidos
	Elastasa	Proteína fibrosa	Hidrólisis para formando péptidos y aminoácidos
Enzimas del intestino delgado (principalmente en el borde en cepillo)	Carboxipeptidasa	Polipéptidos	Hidrólisis de los enlaces peptídicos terminales (extremo carboxílico) llegando a aminoácidos.
	Ribonucleasa y desoxirribonucleasa	Ácidos ribonucleicos (RNA) y ácidos desoxirribonucleicos (DNA)	Hidrólisis llegando a mononucleótidos
	Carboxipeptidasa, aminopeptidasa y dipeptidasa	Polipéptidos	Hidrólisis de los enlaces peptídicos de los extremos carboxílico o amino, o internos
	Enterocinasa	Tripsinógeno	Activa la tripsina
	Sacarasa	Sacarosa	Hidrólisis formando glucosa y fructosa
	a-dextrinasa (isomaltasa)	Dextrina (isomaltosa)	Hidrólisis formando glucosa
	Maltasa	Maltosa	Hidrólisis formando glucosa
	Lactasa	Lactosa	Hidrólisis formando glucosa y galactosa
	Nucleotidasas	Ácidos nucleicos	Hidrólisis formando nucleótidos y fosfatos
	Nucleosidasa y fosforilasa	Nucleósidos	Hidrólisis formando purinas, pirimidinas y pentosa fosfato

Adaptado de Mahan LK (22)

1.6 Hierro

El hierro es un mineral de gran importancia, encontrándose difundido ampliamente en la naturaleza, en sus diferentes estados de oxidación, los cuales van desde Fe+6 hasta el Fe+2, en el organismo y los alimentos. Las formas químicas más estables son el hierro ferroso (forma reducida Fe+2) y el férrico (forma oxidada Fe+3). Este mineral participa en procesos vitales para el ser humano, como la respiración celular y los sistemas enzimáticos encargados de la integridad celular. El 65% del hierro aproximadamente está en la hemoglobina, el 10% en la mioglobina y entre el 1% y el 5% en otros compuestos y enzimas, como la ferritina o hemosiderina. Por lo general el hierro se puede encontrar en el hígado o transportado en la sangre por la transferrina (37). Dentro del organismo el hierro está involucrado en gran variedad de procesos, por lo tanto, este mineral puede actuar como:

1.6.1 Compuesto funcional

El hierro funcional se encuentra especialmente en la hemoglobina \approx 65%, la mioglobina y diferentes enzimas (catalasas, peroxidasas, oxigenasas y transportador de citocromos). El hierro tiene además la capacidad de intervenir en reacciones de oxidación y reducción, siendo un elemento muy reactivo, que interactúa con el oxígeno formando productos intermedios que pueden degradar el ADN y afectar las membranas celulares. La mioglobina y hemoglobina (proteínas hem), son las encargadas de preservar el aporte de oxígeno para el metabolismo oxidativo. Por su parte, la mioglobina, proteína del músculo esquelético, almacena oxígeno como reserva contra una posible privación. La hemoglobina (proteína tetramérica de los eritrocitos) transporta O_2 a los tejidos y promueve el transporte de CO_2 y protones hacia los pulmones (22).

1.6.2 Compuesto de transporte

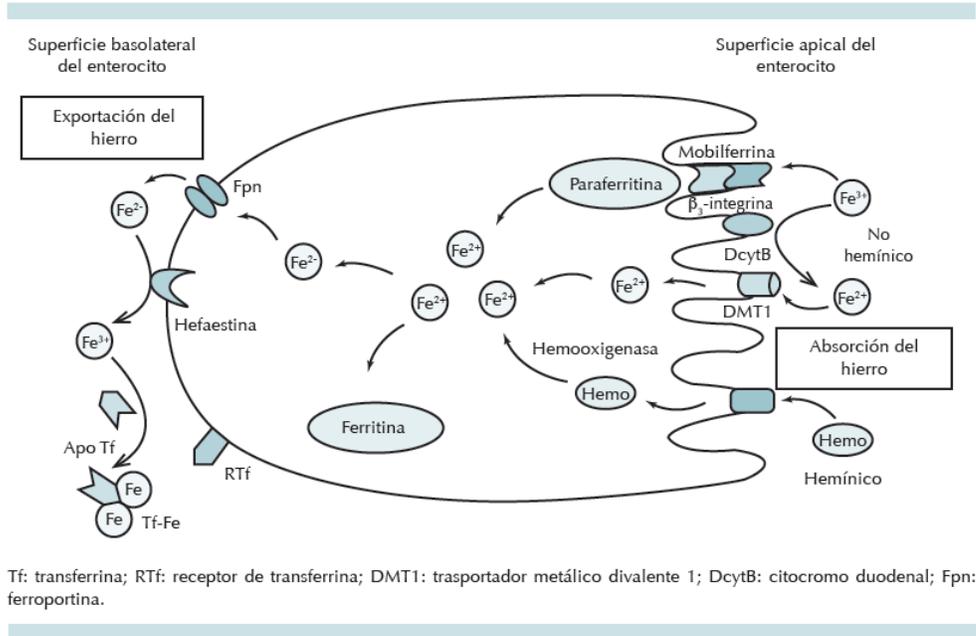
La transferrina es la proteína que se une al hierro para transportarlo en la sangre y su modo de acción consiste en secuestrar el hierro, previniendo que sea quelado por otras sustancias, o ser aprovechado por microorganismos dependientes de él (38). Como proteínas unidas al hierro, la transferrina de la sangre y la lactoferrina de la leche materna, también protegen al cuerpo contra la infección evitando la proliferación de los microorganismos que necesitan acceder al micronutriente (22).

1.6.3 Absorción del hierro

Se ha planteado que solamente se absorbe más o menos el 10% del hierro de la dieta y esto depende de diferentes factores, tanto promotores como inhibidores. El hierro ingerido por vía oral ingresa al tubo digestivo para ser hidrolizado inicialmente en el estómago por la acción del ácido clorhídrico y la pepsina. Estos elementos inician su solubilización, dentro de un ambiente ácido (\approx pH 2.0), facilitando el paso de estado férrico a ferroso. Aunque puede absorberse en todo el intestino delgado este proceso es más eficiente en el duodeno y en la parte superior del yeyuno. La secreción pancreática de bicarbonato aumenta el pH intestinal, lo que promueve la formación de quelatos insolubles (39).

Tal como se había mencionado, en soluciones acuosas el hierro está en dos estados estables de oxidación: ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). Es importante aclarar que para su absorción el hierro debe encontrarse en estado ferroso (Fe^{2+}). En el organismo la absorción del hierro ingerido está limitada por el tipo de hierro presente en el alimento. El hierro absorbido se transporta en la sangre por la transferrina hacia la médula ósea para la síntesis de la hemoglobina en su gran mayoría, o también puede ser eliminado por las células sanguíneas, posibilitando su uso para la formación de compuestos celulares y enzimas respiratorias. Existen dos formas de hierro en los alimentos: hemínico y no hemínico, el primero permite una absorción mayor por parte del enterocito (31). Los mecanismos de absorción del hierro se encuentran representados (Ilustración 1-4).

Ilustración 1-4 Mecanismos de absorción intestinal del hierro



Fuente Tostado (38)

En lo referente a la utilización del hierro, la dializabilidad es un indicador de la biodisponibilidad potencial. Dicho indicador se obtiene a través de la digestión enzimática *in vitro* en condiciones que simulan las fisiológicas en cada una de sus etapas (38).

1.6.4 Deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro es uno de los problemas nutricionales más común en el mundo, es un problema de salud pública en países desarrollados y no desarrollados. En la deficiencia de hierro hay un balance negativo, comprometiéndose la síntesis de hemoglobina y los demás compuestos férricos. Este fenómeno inicia con la depleción del hierro de depósito, o ferropenia latente que no es un estado patológico. Al mantenerse un balance negativo se afecta el hierro funcional llevando a una ferropenia manifiesta con eritropoyesis disminuida por la disminución del aporte de hierro a la célula, observándose un leve descenso de la hemoglobina. En una etapa posterior se ve afectada como tal la síntesis de hemoglobina, generando la anemia ferropénica (40). La anemia es definida como una concentración baja de hemoglobina debajo del punto de corte, los valores que indican anemia varían con la condición fisiológica y han sido establecidos por la OMS para diferentes grupos de población (41).

De acuerdo con la ENSIN 2015, la anemia es un problema de salud pública en Colombia, debido a que 24,7 % de los niños y niñas presentó esta condición, siendo preocupante la prevalencia alta en los niños y niñas de 6 a 11 meses con 62.5% (5).

En concordancia con lo anterior, se ha descrito que los grupos con mayor riesgo de anemia por deficiencia de hierro son los menores de 2 años, niñas adolescentes, mujeres gestantes y ancianos (22). Los menores de dos años se caracterizan por un crecimiento acelerado del cerebro, unido a la explosión de habilidades cognitivas y motoras. Una deficiencia de hierro en la edad preescolar puede reducir de manera significativa la destreza manual, la capacidad de concentración y la memoria (42).

Las adolescentes gestantes tienen un riesgo más alto de deficiencia, asociado con hábitos alimentarios inadecuados y requerimientos elevados por crecimiento. Para las mujeres en edad fértil con deficiencia de hierro se considera especialmente útil una dieta rica en sus fuentes alimentarias o de la suplementación con el micronutriente (22).

Se ha descrito ampliamente que la deficiencia de hierro tiene afectación importante en diversos órganos y tejidos, con manifestaciones clínicas de acuerdo con la afectación que se genere. Esta deficiencia se presenta más frecuentemente en forma de anemia, de tipo ferropénico, considerada la de más fácil diagnóstico (43).

Además de las manifestaciones más frecuentes de la anemia por deficiencia de hierro, se encuentran otros síntomas relevantes como la reducción en la capacidad para hacer esfuerzos físicos, disminución en la capacidad intelectual y de defensa frente a infecciones entre otros (44). Algunas de estas manifestaciones pueden ser o no temporales y reversibles, dependiendo si se presentan en etapas de la vida más tempranas, a pesar de la aplicación del tratamiento correspondiente. (43) En los niños en edad escolar, la deficiencia de hierro puede causar irritabilidad, apatía, fatiga, disminución de la concentración mental unida a deserción escolar, anorexia y disminución de la capacidad de respuesta a las infecciones. (42)

Los síntomas generales de la deficiencia de hierro se muestran a continuación en la tabla 1 -3.

Tabla 1-4 Sintomatología de la anemia

Síntomas Generales	Palidez de piel y mucosas
	Decaimiento
	Anorexia
Manifestaciones circulatorias	Taquicardia
	Hipotensión arterial
Manifestaciones neuromusculares	Cefalea
	Sensación de mareo y vértigo
	Visión borrosa
	Disminución de la capacidad de concentración
	Cansancio precoz
	Dolor muscular
Manifestaciones respiratorias	Disnea
Otras manifestaciones	Hipersensibilidad al frío
	Nauseas

Adaptado de Donato (43)

1.6.5 Selección del compuesto de hierro

El hierro es el micronutriente que representa el mayor reto para adición a los alimentos, porque los compuestos que tienen la mejor biodisponibilidad son los que más interactúan con las matrices, generando cambios organolépticos no deseables. La baja aceptación del consumidor, por el color y olor desagradable en los alimentos fortificados con hierro es una de las principales causas de fallas en los programas (41).

Generalmente, para evaluar las características de una sal de hierro, se usa el sulfato ferroso, como referente. El propósito cuando se selecciona un compuesto de hierro para la fortificación es encontrar el que tenga la mayor biodisponibilidad relativa (BDR) respecto al sulfato ferroso, (relacionado con la cantidad de hierro presente y la eficacia de absorción) sin causar cambios importantes en las propiedades sensoriales del alimento. Igualmente es necesario revisar el costo como factor determinante (41) (45).

Los compuestos para fortificación con hierro se clasifican de acuerdo con su solubilidad a partir de las directrices de fortificación internacional:

- Solubles en agua, biodisponibilidad relativa más alta, comparada con los demás compuestos de hierro, dentro de ellos: sulfato ferroso, gluconato ferroso, bisglicinato ferroso, lactato ferroso, citrato férrico amónico y EDTA ferrosódico.
- Poco solubles en agua, pero solubles en ácido diluido, son solubles en el pH gástrico: fumarato ferroso, succinato ferroso y sacarato férrico.
- Insolubles en agua y poco solubles en ácido diluido, tienen menor efecto en las propiedades sensoriales de las matrices alimentarias, con los niveles empleados actualmente para fortificación: pirofosfato férrico, ortofosfato férrico y polvo de hierro elemental.

Por otra parte, métodos como la encapsulación buscan que el componente de interés se mantenga en el interior de una matriz que lo rodea procurando una liberación dirigida y controlada. Este procedimiento ayuda a prevenir el deterioro del color y también a mejorar la biodisponibilidad de minerales en fortificación múltiple. El sulfato y el fumarato ferroso en sus formas encapsuladas son muy usadas en la fortificación de productos como harinas de cereales y fórmulas infantiles. Dentro de los compuestos usados para la formación de las microcápsulas están los lípidos (41).

1.7 Zinc

La mayor cantidad de zinc está en el músculo esquelético (50-60%), el hueso (25-30%, 40% en el recién nacido a término). Existen otros órganos con niveles de Zn semejantes a los anteriores (hígado, riñón, 50-60 µg Zn/g) (40).

El zinc tiene funciones básicas en el crecimiento celular y la diferenciación de los tejidos de recambio rápido, en sistemas gastrointestinal e inmunitario (40). Debido a sus propiedades fisicoquímicas el zinc es un elemento importante en diferentes funciones catalíticas, estructurales y de regulación celular (46).

Sobre las funciones catalíticas, cerca de 100 enzimas específicas dependen del zinc: oxidoreductasas, hidrolasas, transferasas, liasas, isomerasas y ligasas. Dentro de estas enzimas se destacan: alcohol deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, fosfatasa alcalina y

ARN polimerasa (46). Al existir deficiencia de zinc, las metaloenzimas reducen su actividad, sin cambiar su estructura; añadir zinc restablece la actividad enzimática (47).

Respecto a las funciones estructurales, el zinc posibilita el plegamiento de proteínas de forma tridimensional, permitiendo su actividad biológica (46). La estructura denominada dedos de zinc contiene 4 cisteínas que por las que se une el zinc en un complejo tetraédrico, el cual puede incluir también histidina. Lo anterior se da en proteínas relacionadas en la transducción de señales, diferenciación o proliferación celular, adhesión celular y transcripción (47). El factor de transcripción de metales 1, el receptor de ácido retinoico y otras enzimas (superóxido dismutasa de cobre y zinc) son algunas proteínas que requieren zinc para su función estructural (46).

Con relación a las funciones de regulación celular, el zinc interviene en la expresión del gen de la metalotioneína, proteína ligadora del zinc en el hígado; asimismo en la apoptosis (muerte celular programada) y en la señalización sináptica (46).

En conclusión, el zinc lleva a cabo múltiples funciones en la preservación del material genético, en las que se incluye la transcripción del ADN, la traducción del ARN y la división celular (46). De la misma manera participa en las principales vías metabólicas de los macronutrientes, recambio y síntesis de tejido conjuntivo, síntesis del heme y embriogénesis (48).

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, el suministro de zinc es importante especialmente para los niños pequeños, mujeres embarazadas y madres lactantes, por su función en la división celular, síntesis proteica y crecimiento. La carencia de zinc continúa siendo un problema de salud pública, especialmente en países en desarrollo a pesar de presentarse una disminución de las enfermedades prevalentes en la infancia. En general todos los grupos de edad están en riesgo de deficiencia de zinc, sin embargo, los lactantes y los niños pequeños son los más susceptibles de padecerla (41).

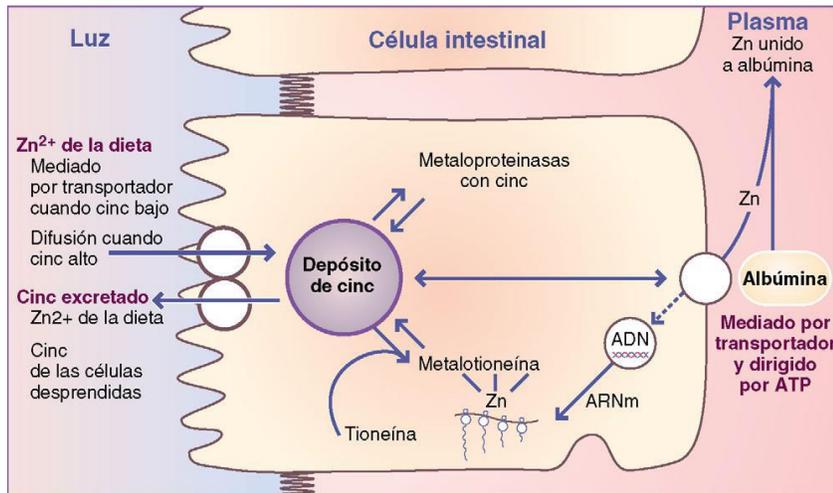
1.7.1 Absorción de zinc

La absorción de zinc se da en el intestino delgado por un proceso transcelular, el yeyuno tiene la mayor velocidad de transporte para este micronutriente (40). Para la absorción de

zinc existen dos vías, una saturable, mediada por ATP, eficaz con ingestas y concentraciones lumbinales de zinc bajas, y una pasiva en la que está incluido el movimiento paracelular con concentración intraluminal e ingestas más elevadas. (22) (40). La solubilidad del zinc en la luz intestinal es un factor crítico, sin embargo, los iones de zinc están unidos habitualmente a aminoácidos o a péptidos y se liberan en el borde en cepillo para ser absorbidos mediante el mecanismo de transporte. Posterior a esto, se da la unión de estos iones a la metalotioneína y a otras proteínas dentro de la célula absorbente. La primera es la encargada de transportar el zinc (por movimiento transcelular) hasta el borde basolateral, para pasar desde el enterocito hasta la sangre. Este paso se produce por transporte activo, puesto que es mayor la concentración sanguínea de zinc (22). (Ilustración 1-5)

La absorción del zinc es dependiente no solo de la cantidad en la dieta, sino también de la presencia de compuestos como fitatos. Una dieta con un buen aporte de proteínas facilita la absorción de zinc por la formación de quelatos (22).

Ilustración 1-5 Modelo de la absorción del zinc



Fuente: Krause (22)

1.7.2 Deficiencia de zinc

Referente al estado nutricional del zinc, existe una falta de indicadores confiables y que cuenten la aceptación y sensibilidad adecuada, lo que dificulta en análisis de la prevalencia mundial de su carencia. Dentro de los indicadores disponibles están la concentración de

zinc en el plasma y en el cabello, que logran detectar únicamente cambios por estados graves, es posible que las carencias más leves no se detecten (41).

Sin embargo, hay evidencias para sugerir que la deficiencia de zinc es común en países con menores ingresos. Por ejemplo, los alimentos de origen animal, fuentes de zinc, no son accesibles para muchas de las poblaciones más pobres del mundo, lo que afecta a los lactantes y los niños pequeños de manera específica (49). Se ha observado en estudios aleatorios controlados, que los niños con desnutrición crónica y/o con bajo zinc plasmático, al ser suplementados con este micronutriente tienen respuesta positiva, lo que indicaría que la carencia es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo. Si lo anterior se confirmara, indicaría la afectación de hasta un tercio de los niños en los países pobres y siendo una de las causas del retardo en el crecimiento (41).

Con el uso de las hojas de balance de alimentos de la FAO, se ha calculado que cerca de 20% de la población mundial podría estar en riesgo de desarrollar carencia de zinc, de acuerdo con la disponibilidad de alimentos fuente. Las regiones geográficas más afectadas son, el sur de Asia, África y el Pacífico Occidental. Es posible que la carencia de este mineral esté muy relacionada con la de hierro, por compartir fuentes alimentarias e inhibidores. Los principales factores de riesgo para la carencia de zinc son las dietas pobres en zinc y altas en fitatos, así como disminución de la absorción: parasitosis intestinales y diarrea, utilización deficiente del zinc y enfermedades genéticas (41). La deficiencia de zinc puede considerarse tan grave como la de hierro ya que afecta a la población tanto de países en vías de desarrollo como a los países desarrollados. Según estudios realizados con base en encuestas nutricionales, la ingesta promedio de zinc a nivel mundial se encuentra entre el 50% y 80% de los requerimientos diarios (50).

Considerando que no existe una reserva funcional o almacenamiento corporal propiamente dicho de zinc, se requiere un aporte dietético adecuado y regular. Con la deficiencia de zinc, ocurren cambios generales inespecíficos en el metabolismo, como reducción en la velocidad del crecimiento, aumento de infecciones y aparición de lesiones cutáneas (47). Sufren manifestaciones también por deficiencia los sistemas, gastrointestinal, nervioso central, inmunológico, y reproductivo (49) .

Teniendo en cuenta que la deficiencia de zinc tiene una respuesta generalizada e inespecífica, este se distingue como un nutriente de tipo II, es decir que no tiene signos o síntomas característicos, sin embargo, se ha observado un crecimiento deficiente de manera generalizada. En consecuencia, una de las características clínicas más estudiadas en relación con la deficiencia de zinc es el deterioro del crecimiento y desarrollo. Sin embargo, los mecanismos involucrados aún no se entienden bien. Lo anterior es de suma importancia en los períodos de crecimiento rápido, como el embarazo, la infancia y la pubertad, por tener necesidades aumentadas del micronutriente. Generalmente, las manifestaciones de la deficiencia de zinc varían de acuerdo con la edad. En la primera infancia, un síntoma importante es la diarrea, también puede observarse deterioro de la función cognitiva, la memoria, problemas de comportamiento y disminución en la capacidad de aprendizaje. Los problemas de la piel pueden ser mayores a medida que el niño crece. (47).

1.7.3 Fortificación con zinc

La biodisponibilidad del zinc depende, en gran parte, de la proporción de alimentos altos en fitatos en la dieta, como cereales y leguminosas. La razón molar de fitato: zinc en los alimentos es muy útil para su disponibilidad. Al encontrarse una relación más alta (mayor a 15:1), la absorción del zinc disminuye. Con el aumento de alimentos fuente de proteínas animal mejora, tanto la ingesta total, como la eficiencia de la absorción del zinc (41).

1.7.4 Selección del compuesto de zinc

Los compuestos de zinc que se usan para la fortificación de alimentos son el sulfato, cloruro, gluconato, óxido y estearato. Por ser blancos o incoloros, tienen pocas alteraciones de color, cuentan con solubilidad variable en el agua; algunos pueden llegar a tener un sabor desagradable al combinarse con otros alimentos. El más común es el óxido de zinc, con menor costo y baja solubilidad en agua. Se ha observado que la absorción del zinc de productos de cereales fortificados es similar en óxido y sulfato de zinc, el cual es un compuesto con mayor solubilidad, considerando que el óxido es también soluble en el ácido gástrico (41).

Se ha demostrado que la ingesta y absorción de este mineral aumenta con el consumo de alimentos fortificados con zinc, es necesario avanzar en la investigación sobre eficacia y

efectividad de los programas de fortificación con zinc a gran escala (51). En la fortificación con zinc, su absorción depende no solamente del contenido y su forma química, sino también de otras sustancias presentes, la composición completa de la ración, factores fisiológicos del individuo e interacciones presentes (52).

1.7.5 Compuestos que modifican la absorción de hierro y zinc

Se ha descrito que el ácido ascórbico (AA), y otros ácidos orgánicos tienen la característica de aumentar la absorción del hierro, debido a la capacidad que tienen estos compuestos para reducir el hierro no hem. La adición de ácido ascórbico a alimentos fortificados es una práctica ampliamente adoptada por la industria alimentaria. Se puede utilizar una razón molar más alta de ácido ascórbico: hierro (4:1) para alimentos con alto contenido de fitatos. Al usar ácido ascórbico como aditivo alimentario se pierden grandes cantidades en el almacenamiento y preparación de los alimentos, por su estabilidad, por esta razón puede ser una opción de alto costo (53).

Con respecto a los fitatos, se ha considerado que son anti nutrientes debido a que, durante el tránsito gastrointestinal, impiden la absorción de algunos oligoelementos y minerales esenciales, generando deficiencias de calcio, hierro y zinc. Se han realizado estudios que buscan eliminar el fitato de los alimentos con procesamiento adecuado, buscando mejorar la biodisponibilidad y evitar las deficiencias de micronutrientes (53).

Se ha evidenciado que es posible reducir de forma importante el ácido fítico de los cereales y leguminosas mediante diferentes métodos, algunos de los cuales promueven una absorción adecuada de hierro en alimentos complementarios elaborados con cereales o soya. Para mejorar la absorción de hierro, la razón molar ácido fítico: hierro debe ser por lo menos 1:1, o incluso menos de 0,5:1 (41).

Se ha observado que con la molienda es posible eliminar casi el 90% del ácido fítico de los cereales, pero el 10% restante funciona como un inhibidor fuerte, por lo tanto, es necesaria la acción de las fitasas para lograr la degradación completa. Esto se logra por procesos tradicionales como el remojo, germinación y fermentación, activando las fitasas naturales de los alimentos. En procesos industriales pueden agregarse fitasas exógenas o trigo o centeno integral como fuentes naturales de las mismas (41).

2 Objetivos

2.1 General

Revisar el estado del arte sobre la aplicación de la metodología de estimación de bioaccesibilidad *in vitro* en hierro y zinc en diferentes alimentos fortificados.

2.2 Específicos

- Realizar el proceso de revisión bibliográfica, sobre la estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes matrices alimentarias fortificadas.
- Analizar las metodologías empleadas para la estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes matrices alimentarias fortificadas.
- Plantear una propuesta para la estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en mezclas vegetales.

3 Metodología

3.1 Tipo de estudio

Revisión sistemática cualitativa para identificar estado del arte sobre las metodologías de medición de bioaccesibilidad en hierro y zinc que se han empleado en diferentes alimentos fortificados.

3.2 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las tendencias actuales en la medición de la bioaccesibilidad de hierro y zinc en diferentes matrices alimentarias utilizadas para procesos de fortificación de alimentos en poblaciones con riesgo de deficiencia de micronutrientes?

3.3 Estrategia de búsqueda

La búsqueda fue realizada en la base de datos PubMed, proyecto desarrollado por la National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la National Library of Medicine (NLM). Esta base de datos se especializa en los campos de la biomedicina, salud, ciencias de la vida, ciencias del comportamiento, ciencias químicas y bioingeniería. Además de las bases de datos se realizó búsqueda de referencias cruzadas de forma manual y literatura en revistas especializadas, la búsqueda abordo desde el 2002 hasta 2019.

Se diseñó una estrategia de búsqueda de alta sensibilidad compuesta por lenguaje libre y vocabulario controlado (MeSH), a partir de la estrategia PICO. La estrategia de búsqueda se complementó con operadores booleanos, utilizando los siguientes términos: "fortified complementary foods", "fortified foods", "Food, Fortified", "infant foods", "vegetable mixes", Bioaccessibility, "simulated digestion", "mineral bioaccessibility", "In vitro digestion", Iron,

"Iron, dietary", "dietary,Iron", zinc, "iron absorption", "zinc absorption", "iron bioaccessibility", "zinc bioaccessibility", "iron fortification", "zinc fortification". (Anexo 1).

3.4 Criterios de elegibilidad de la selección de artículos

Se realizó la búsqueda de artículos científicos que cumplieran con los siguientes aspectos:

- Objetivos claramente establecidos
- Metodología de determinación de bioaccesibilidad clara y explícita
- Reporte de datos cuantitativos y cualitativos según el caso
- Publicaciones científicas en idioma inglés y español

Fueron incluidos los estudios que cumplían con los siguientes criterios: a) Identificación de las matrices alimentarias utilizadas para fortificación de hierro y zinc, b) Identificación del tipo de sal empleada en la fortificación y c) Descripción del método de bioaccesibilidad *in vitro*.

Se excluyeron estudios con los siguientes criterios: a) estudios de biodisponibilidad, b) estudios de bioaccesibilidad que no incluyeran hierro y zinc, c) matrices alimentarias con muy bajo consumo y d) estudios sobre alimentos biofortificados.

3.5 Obtención y recopilación de los datos

Para la revisión y análisis de los artículos se procedió a la lectura y verificación de títulos, resúmenes identificados en la búsqueda y posteriormente los textos completos de los no excluidos, seleccionándose así los que cumplían con los criterios de inclusión mencionados inicialmente.

Para los artículos seleccionados, se procedió a la revisión de los métodos utilizados para obtener los datos de bioaccesibilidad del hierro y zinc incluyendo variables como el tipo de alimentos fortificados y las sales utilizadas en la fortificación, con el fin de abordar los temas que se consideran de mayor interés. Igualmente se consultaron artículos originales que contenían de manera completa algunas metodologías citadas, con el fin de realizar una exploración más a fondo de estas.

Se construyó una matriz de análisis donde se consignaron las características de cada uno de los artículos para la posterior selección por parte de los evaluadores. (Anexo 2).

Aspectos éticos.

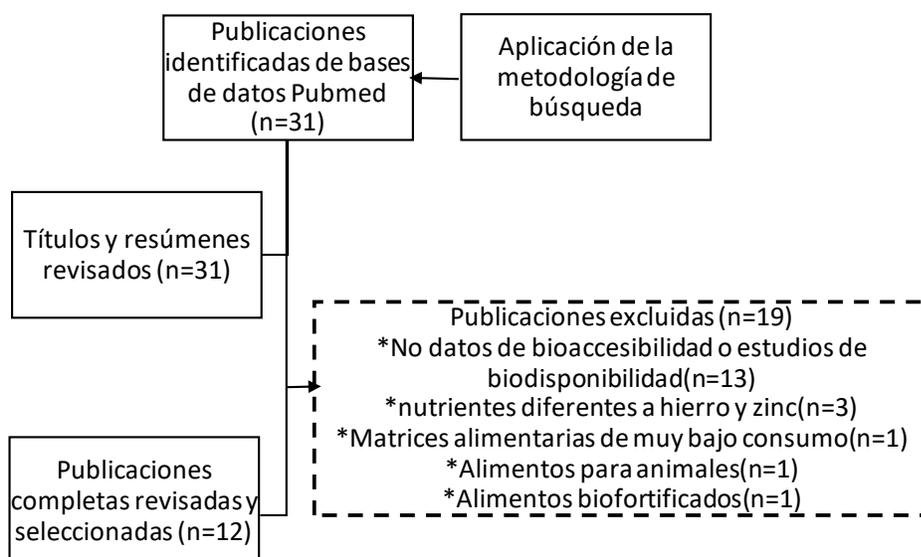
En el presente trabajo, no existe conflicto de intereses y las ideas presentadas solo representan la posición del investigador y no la de la Universidad Nacional de Colombia

4 Resultados y Discusión

4.1 Resultados de la búsqueda

Posterior a la realización de la búsqueda mencionada en el ítem: estrategia de búsqueda, se identificaron 31 artículos, 19 de los cuales se descartaron, por diferentes criterios. 13 de ellos informan sobre la realización del proceso de bioaccesibilidad, pero no reportaban la metodología empleada por lo que no era posible adelantar algún tipo de análisis al respecto, 3 no contenían análisis de bioaccesibilidad específicos de hierro o zinc, 1 de los estudios se aplicaba a una matriz alimentaria de muy bajo consumo, 1 se aplicaba para alimentación animal y 1 se realizó utilizando alimentos biofortificados. (Ilustración 4-1)

Ilustración 4-1 Identificación de estudios seleccionados para bioaccesibilidad



Fuente: elaboración propia

4.2 Variables analizadas reportadas en la literatura científica

Se analizaron las siguientes variables: naturaleza de la matriz alimentaria, tipo de fortificación (sal mineral), y método de bioaccesibilidad empleado. Los principales aspectos de las variables analizadas se encuentran resumidas (tabla 4-1)

Tabla 4-1 Estudios de estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes matrices alimentarias fortificadas

Año	Autor	Objetivos	Matriz Alimentaria	Compuestos para fortificación	Método bioaccesibilidad
2019	Wahengbam (54),	Investigar la bioaccesibilidad de Fe y FA en el arroz sancochado fortificado y no fortificado.	Arroz parborizado fortificado y no fortificado	FeNaEDTA	Digestión pasiva método de Minekus. Fase oral, gástrica e intestinal. Análisis de los sobrenadantes y el hierro bio accesible con espectrofotometría de plasma.
2019	Bryszewska (55)	Comparar la bioaccesibilidad del hierro de dos preparaciones: suplementos dietéticos y fortificantes de alimentos que contienen sulfato ferroso micro encapsulado o lactato ferroso.	Suplementos nutricionales comerciales, sulfato y lactato ferroso encapsulado, pan y sándwich para el desayuno.	Sulfato ferroso, lactato ferroso	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior solubilidad y análisis por espectrofotometría de absorción atómica.
2017	Rebellato (56)	Describir el efecto de diferentes compuestos de hierro utilizados para fortificar la harina de trigo integral sobre las características reológicas de la masa, las propiedades de calidad del pan integral y la bioaccesibilidad de Fe, Zn y Ca	Harina de trigo integral (WWF), Panes de trigo integral (WWRB)	Sulfato ferroso monohidratado (FS), fumarato ferroso (FF), hierro reducido (RI), ácido férrico, NaFeEDTA, sulfato ferroso micro encapsulado (FSm) y fumarato ferroso micro encapsulado (FFm)	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior solubilidad y dializabilidad, análisis por espectrofotometría de absorción atómica.
2016	Icard-Vernière (57)	Evaluar la bioaccesibilidad del hierro y el zinc en salsas de amaranto y malva judía, solo o mezclado con una porción de pasta de maíz, como se consume habitualmente.	Pasta de maíz más salsas vegetales de hoja de amaranto y malva judía. Pasta espesa de cereal "tô" a partir de harina de maíz, la mezcla de los dos llam plato entero.	NaFeEDTA o sulfato de Fe	Método estático con adición de enzimas, fase oral, gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por espectrofotometría de absorción atómica.

Resultados y discusión

Año	Autor	Objetivos	Matriz Alimentaria	Compuestos para fortificación	Método bioaccesibilidad
2015	Kruger, Johanita (58)	Determinar el aporte de minerales de diferentes platos tradicionales de verduras de hoja verde (GLV) de África y sus comidas compuestas con gachas de maíz fortificadas y sin fortificar	Platos GLV (tradicionales de verduras de hoja verde) coladas de maíz fortificadas y sin fortificar, platos compuestos por verduras y colada.	Hierro electrolítico, óxido de zinc	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por colorimetría.
2012	Oghbaei,(33)	Estudiar los efectos de la refinación, el procesamiento y el enriquecimiento de la harina de mijo y sus productos en términos de contenido y bioaccesibilidad / digestibilidad in vitro de nutrientes, antinutrientes y fitoquímicos seleccionados.	Productos a base de mijo, fideos y obleas	Fumarato ferroso y sulfato de zinc.	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis de hierro en el dializado por colorimetría. El Zn por espectrofotometría de absorción atómica
2011	Binaghi, Maria J(60)	Evaluar la influencia sobre la bioaccesibilidad de minerales del consumo conjunto de infusiones de yerba mate y leche fortificada de infusiones de yerba mate y leche fortificada	infusiones de yerba mate y leche fortificada	El sulfato ferroso, El bisglicinato ferroso, NaFeEDTA.	Método estático con adición de enzimas, fase oral, gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por espectrofotometría de absorción atómica.
2010	Tripathi (61)	Determinar la viabilidad del enriquecimiento con zinc y determinar la bioaccesibilidad del mineral fortificado y la estabilidad al almacenamiento en el mijo (Sorghum vulgare) y el mijo de perla (Pennisetum glaucum).	Mijo de sorgo (Sorghum vulgare) y el mijo de perla (Pennisetum glaucum).	Estearato de zinc, EDTA disódico y ácido cítrico.	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por espectrofotometría de absorción atómica.
2010	Tripathi, Bhumika (62)	Explorar el mijo dedo, ampliamente cultivado y comúnmente consumido en el sur de la India como un vehículo para la fortificación con zinc.	Harina de mijo "dedo"	Oxido de zinc Estearato de zinc	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por espectrofotometría de absorción atómica.
2009	Hemalatha (63)	Examinar la influencia del hierro y el calcio añadidos exógenamente a niveles terapéuticos sobre la bioaccesibilidad del zinc de granos alimenticios seleccionados.	Cereales - arroz, trigo y sorgo, y garbanzos, frijol mungo y Guandúl.	Sulfato ferroso, carbonato de calcio,	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por espectrofotometría de absorción atómica.
2007	De-Regil (64)	Seleccionar compuestos de hierro prometedores para su uso en la fortificación de atoles, utilizando técnicas de diálisis enzimática in vitro-diálisis, y al mismo tiempo considerar su respuesta a los potenciadores e inhibidores de absorción de hierro conocidos.	Atole de maíz fortificado y pretratado.	Sulfato ferroso, fumarato ferroso y el bisglicinato ferroso quelado, cloruro férrico, citrato de amonio férrico y ácido etilendiaminotetraacético de sodio férrico quelado (NaFeEDTA).	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente.

Año	Autor	Objetivos	Matriz Alimentaria	Compuestos para fortificación	Método bioaccesibilidad
2002	Bilal, (65)	Determinar la biodisponibilidad <i>in vitro</i> de hierro de la harina de trigo fortificada mediante digestión enzimática <i>in vitro</i> y fermentación simulando la condición del intestino delgado y el colon en el laboratorio	Harina de trigo bien molido grado 1 (extracción al 80%) para fines de fortificación	Sulfato ferroso	Método estático con adición de enzimas, fase gástrica e intestinal. Posterior dializabilidad y análisis por espectrofotometría de absorción atómica.

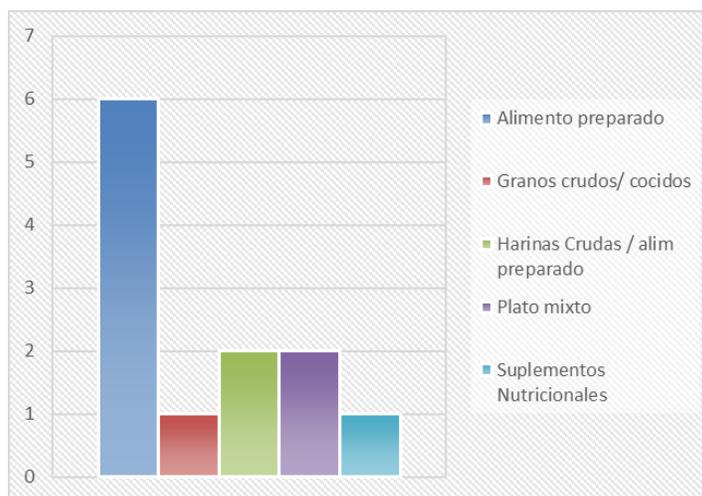
Fuente: elaboración propia

Los objetivos planteados en los diferentes trabajos están orientados en su mayoría a evaluar la bioaccesibilidad de minerales de las diferentes matrices alimentarias fortificadas, así como también a determinar la viabilidad de enriquecimiento o fortificación con diferentes sales minerales.

4.2.1 Matrices alimentarias

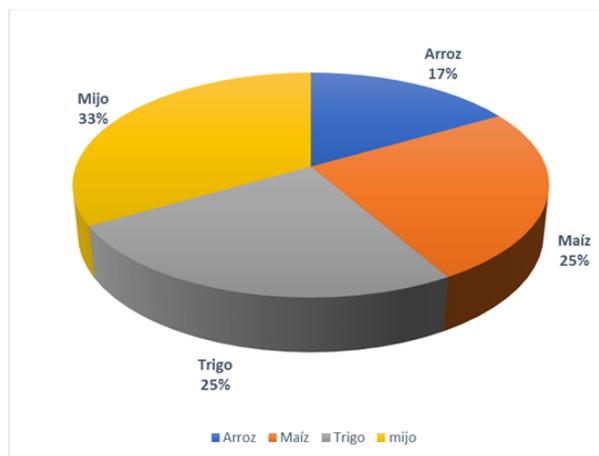
Las matrices alimentarias empleadas para la medición de bioaccesibilidad fueron en su mayoría (92%) a base de cereales (Tabla 4-1). Los cereales más evaluados fueron en su orden mijo, trigo, maíz y arroz. Dentro de las características de estas matrices se pueden mencionar: Alimentos preparados que incluyen panes, pastas, coladas; bebidas como infusiones de yerba mate y leche fortificada; granos cocidos; harinas crudas, platos mixtos y suplementos nutricionales comerciales. La distribución del tipo de matrices se puede observar (gráfica 4-1).

Gráfica 4-1 Tipos de matrices utilizadas en los estudios de medición de bioaccesibilidad



Los cereales empleados en la elaboración de las matrices fueron el arroz, maíz, trigo y mijo, la distribución porcentual de los mismos se presenta (gráfica 4- 2).

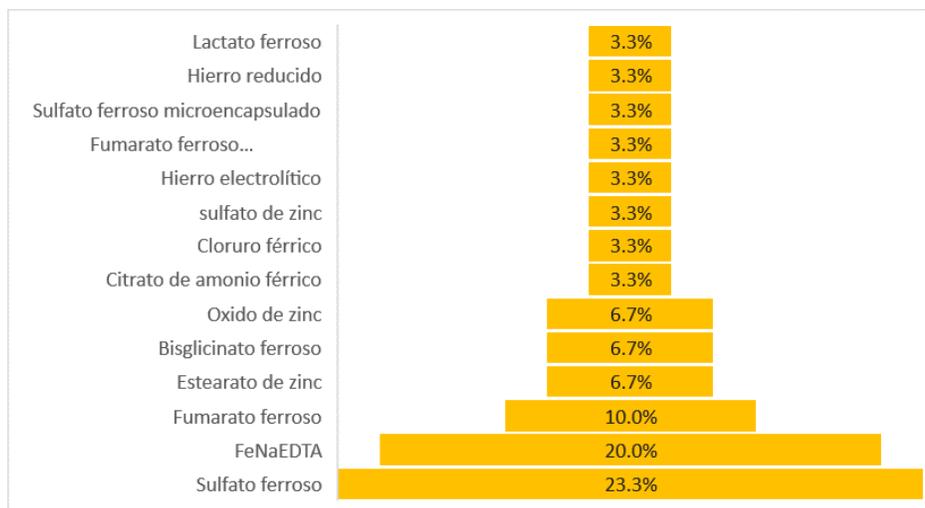
Gráfica 4-2 Porcentaje de participación de los diferentes tipos de cereales en las matrices alimentarias para medición de bioaccesibilidad



4.2.2 Tipo de sales empleadas en la fortificación

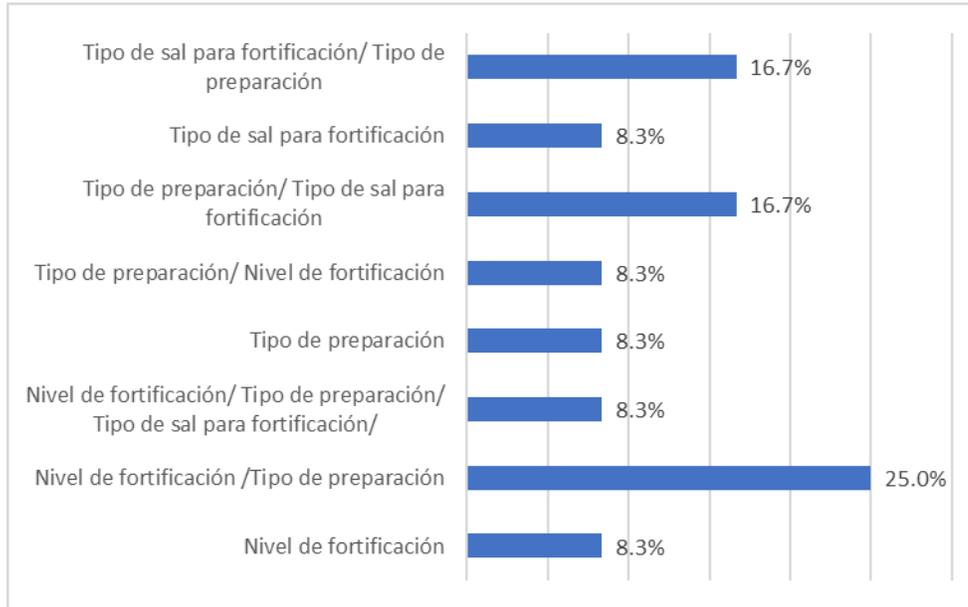
Se puede observar que en los diferentes estudios se empleó una alta variabilidad en tipos de sal de hierro para la fortificación, como sulfato ferroso, fumarato ferroso, FeNaEDTA, lactato ferroso, hierro reducido, sulfato ferroso micro encapsulado, fumarato ferroso micro encapsulado, hierro electrolítico, bisglicinato ferroso, cloruro férrico, citrato de amonio férrico. Las sales de zinc se limitaron a óxido de zinc, estearato de zinc y sulfato de zinc. (Gráfica 4-3).

Gráfica 4-3 Porcentaje de participación de sales para fortificación de las matrices



Para la realización de los estudios se incluyeron diferentes variables, como, por ejemplo, los niveles de fortificación, tipos de preparación y tipos de sal utilizados (Gráfica 4-4).

Gráfica 4-4 Variables aplicadas a las matrices en los estudios de bioaccesibilidad



4.2.3 Método de medición de bioaccesibilidad

Teniendo en cuenta que se pretende en las investigaciones imitar las condiciones en las que se da la digestión *in vivo*, es muy importante presentar los resultados teniendo en cuenta la secuencia del proceso desde el tratamiento preliminar de la materia prima, hasta la fase final del método, fase intestinal.

- Tratamiento preliminar de la muestra

En lo referente al tratamiento aplicado a las matrices, previo a la fase oral/gástrica, se evidencia la aplicación de diferentes tratamientos, dentro de los que se encuentran, para los alimentos preparados, actividades relacionadas con el acondicionamiento de las materias primas, la preparación del producto: masas, pastas y atole, adición de los nutrientes a fortificar etc. (Tabla 4-2)

Como paso previo al proceso de digestión *in vitro*, la mayoría de las muestras se homogenizan o se muelen.

Tabla 4-2 Tratamientos preliminares realizados a las matrices de alimentos preparados

Tipo de Matriz	Matriz alimentaria	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	TRATAMIENTO 4
ALIMENTO PREPARADO	Arroz parbolizado	Pulido de arroz	Remojo, fortificación	Vaporización	Rehidratación, liofilización pulverización
	Pan integral		Preparación de pan integral con harina fortificada	Congelación (-20 ° C)	Homogenización
	Productos a base de mijo, fideos y obleas	Preparación de fideos y obleas con harina fortificada y no fortificada	Calentamiento de fideos y obleas durante 10 minutos	Molienda	Congelación
	Mezclas de leche con mate cocido	Fortificación de leche	Fortificación de la infusión de mate	Mezclado	Homogenización
	Atole de maíz fortificado y pretratado.	Preparación del atole 30 g / 500 mL agua	Fortificar a temperatura ambiente con hierro	Incubación con o sin fitasa y ácido ascórbico	Homogenización
	Chapatis y NAN con harina de trigo	Preparación de chapatis y NAN con harina de trigo fortificada	Preparación de chapatis y NAN con harina de trigo no fortificada	Liofilización	Molido con mortero y molino eléctrico

Elaboración propia

Para las matrices alimentarias que se clasifican como granos crudos/ granos cocidos, se aplica principalmente la cocción, la adición de los nutrientes a fortificar y la homogenización. (tabla 4-3)

Tabla 4-3 Tratamientos preliminares realizados a las matrices de granos crudos/ cocidos

Tipo de Matriz	Matriz alimentaria	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3
Granos crudos/ cocidos	Arroz, trigo y sorgo; garbanzos, frijol mungo y Guandúl	Los granos alimenticios se cocinaron a presión durante 10 minutos	Adición de minerales exógenos	Homogenización antes de su uso

Elaboración propia

Las matrices de plato mixto refirieron la preparación de recetas estandarizadas con ingredientes que incluyeron además de cereales, verduras propias de la región, posteriormente homogenización y congelación entre otros tratamientos (tabla 4-4).

Tabla 4-4 Tratamientos preliminares realizados a las matrices de plato mixto

Tipo de Matriz	Matriz alimentaria	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	TRATAMIENTO 4
Plato mixto	Salsas no fortificadas y fortificadas, platos enteros preparados.	Preparación de salsas con receta estandarizada con amaranto y malva judía, pasta de cacahuete, pescado seco	Preparación del "tô", pasta espesa a base de maíz.	Preparación del plato entero con la mezcla anterior 2:1	Homogenización antes de su uso
	Alimentos individuales, GLV+maíz no fortificado, GLV+ maíz fortificado.	Preparación muestras de los platos de GLV elaborados durante todo el período de cosecha.	Elaboración de gachas de maíz fortificadas y sin fortificar	Preparación del plato entero con la mezcla anterior.	Congelación, liofilización y almacenamiento.

Elaboración propia

La matriz que corresponde a suplementos nutricionales refirió la adición directa de suplementos comerciales o micro encapsulados a pan tipo rollo o sándwich para el desayuno, así como la homogenización final de la muestra (tabla 4-5).

Tabla 4-5 Tratamientos preliminares a las matrices de suplementos nutricionales

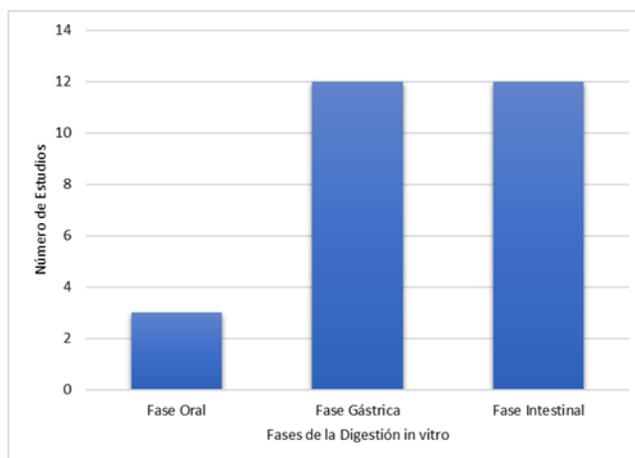
Tipo de Matriz	Matriz alimentaria	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	TRATAMIENTO 4
Suplementos nutricionales	Suplementos nutricionales comerciales o micro encapsulados, adicionados al pan o sándwich	Preparación de un sándwich de desayuno, Utilización de rollo de pan convencional	Submuestras de 1 g se pesaron con precisión, se congelaron y se almacenaron	Adición del suplemento o encapsulado	Homogenización antes de su uso

Elaboración propia

Fases oral, intestinal y gástrica: en todos los trabajos seleccionados se aplicaron metodologías para estimar la bioaccesibilidad *in vitro*, (tabla 4-1) previamente utilizadas y probadas por otros autores. Los resultados en su mayoría coinciden con la aplicación de parámetros que involucran algunas diferencias en cada una de las fases de la digestión simulada. Dentro de ellos se resaltan el pH, tipo y concentraciones de enzimas y el uso de otras sustancias adicionadas en los fluidos oral, gástrico e intestinal. Todas las investigaciones coinciden en la utilización de la temperatura de 37° C (cuerpo humano), conservando así condiciones ideales para la actividad enzimática.

La determinación de incluir las tres fases: oral, intestinal y gástrica en gran medida pudo estar determinada por la naturaleza de la matriz alimentaria a estudiar o en su defecto por otros factores contemplados en la investigación. En el 25% de estudios se aplicaron tres fases: oral, gástrica e intestinal, mientras que en el porcentaje restante 75%, solamente se realiza el proceso para fase gástrica e intestinal (gráfica 4-5).

Gráfica 4-5 Fases realizadas en los estudios de bioaccesibilidad



- Fase oral:

En la información de los estudios, no se refieren datos sobre el pH aplicado en la simulación de esta fase. En todos los casos se aplica como única enzima la α -amilasa; para uno de los estudios, se empleó de origen humano, el segundo de origen microbiano y el tercero no reporta origen. Así mismo, en los pocos estudios (3) que consignan información sobre la concentración de la enzima se observa una variabilidad en la forma de reportar la concentración de esta, lo que dificulta su análisis. Solamente 1 de los estudios reporta un dato de actividad de α -amilasa

de 25 U/ml, mientras que en otro se informa sobre el uso de la enzima diluida al 0.3% sin reportar su actividad, (tabla 4-6). En uno de los estudios se reporta la inclusión de NaCl, KCl y CaCl₂, como parte integral de la saliva, para las demás investigaciones no se reporta adición de fluido salival.

Se evidencia variación del tiempo empleado en esta fase (gráfica 4-6), se emplearon tiempos con un margen de variación entre 2 a 30 minutos.

Gráfica 4-6 Duración de la fase oral de la digestión *in vitro* en minutos



Tabla 4-6 Enzimas utilizadas en la etapa oral para cada uno de los estudios

Enzima	Fase Oral	
	α-amilasa	
	Actividad (U/ml)	Origen
Wahengbam	25	Humana
Bryszewska	No se realiza	
Rebellato	No se realiza	
Icard-Vernière	No especifica	Bacillus licheniformis
Kruger	No se realiza	
Oghbaei	No se realiza	
Binaghi	Solución al 0.3%	No especifica
Tripathi	No se realiza	
Tripathi	No se realiza	
Hemalatha	No se realiza	

Enzima	Fase Oral	
	α-amilasa	
	Actividad (U/ml)	Origen
De-Regil	No se realiza	
Bilal	No se realiza	

Elaboración propia

▪ Fase gástrica

En todos los estudios, se hace énfasis en verificar que para la adición de la enzima se debe haber alcanzado el pH adecuado para garantizar la actividad de la misma, el cual fue establecido en un valor de 2, que se alcanza con la adición de HCl generalmente 6M. La enzima empleada de manera unánime es pepsina de origen porcino con valores de actividad variables, (tabla 4-7).

Tabla 4-7 Enzimas utilizadas en la fase gástrica para cada uno de los estudios

Enzima	Fase Gástrica	
	Pepsina	
	Actividad (U/ml)	Origen
Wahengbam	177	Porcina
Bryszewska	45	No específica
Rebellato	848	Porcina
Icard-Vernière	14900 (1 ml)	Porcina
Kruger	1200	Porcina
Oghbaei		Porcina
Binaghi	1131	Porcina
Tripathi	1200	Porcina
Tripathi		Porcina
Hemalatha		Porcina
De-Regil	150	Porcina
Bilal	3692	Porcina

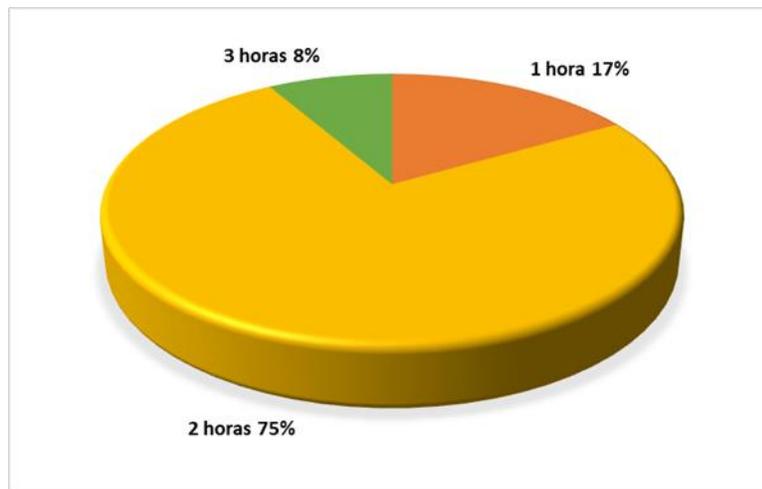
Elaboración propia

Para el tiempo de duración de la etapa gástrica, (tabla 4-8 y la gráfica 4-7), en general los autores mencionan una duración de 2 horas, con excepción de Icard-Vernière, quien propone una duración de 1 hora, lo mismo que De-Regil. El investigador que más tiempo asigna en digestión gástrica es Bilal con 3 horas.

Tabla 4-8 Tiempo de duración de la fase gástrica en cada estudio

Estudio	Duración Fase Gástrica
Bilal	3h
Rebellato, Kruger, Oghbaei, Binaghi, Wahengbam, Bryszewska, Tripathi, Hemalatha	2h
De-Regil, Icard-Vernière	1h

Elaboración propia

Gráfica 4-7 Tiempo de duración de la fase gástrica en horas en los estudios de bioaccesibilidad y distribución porcentual

- Fase intestinal

En esta fase, nueve (75%) de los estudios revisados refieren la aplicación de metodologías que proponen tomar alícuotas del alimento digerido por la pepsina para comenzar la etapa intestinal, e incluir una bolsa de diálisis, que contiene una solución de bicarbonato de sodio y agua equivalente a la acidez titulable del digerido, medida previamente, para posteriormente adicionar la mezcla de pancreatina y bilis, continuando con la digestión intestinal. En los otros tres estudios (25%) se adiciona la mezcla de pancreatina y bilis a la solución digerida de manera directa, previo ajuste del pH.

Se muestran las características de las enzimas de la fase intestinal (tabla 4-9) las cuales provienen de la pancreatina, de origen porcino. Igualmente se puede observar que la bilis en su mayoría es de origen porcino, reportando también origen bovino y ovino, en el estudio de Bryszewska no se reporta de donde proviene. La concentración de bilis en todos los casos

está reportada en mg/ml, presentándose una gran variabilidad, con datos desde 0.9 a 12.5 mg/ml.

Las concentraciones tanto de enzimas como de bilis son variables, puesto que éstas dependen directamente de la cantidad de volumen de fluido a trabajar, de su composición y de la concentración de electrolitos de la mezcla final.

Tabla 4-9 Características de las enzimas y bilis utilizadas en la fase intestinal en cada uno de los estudios

Enzima	Fase Intestinal			
	Pancreatina ¹ (composición y concentración de enzimas)		Bilis	
	Cantidad	Origen	Cantidad	Origen
Wahengbam	0.1 mg/ml	Porcina	0.9 mg/ml	Porcina
Bryszewska	0.04 mg/ml	No específica	0.25 mg/ml	No específica
Rebellato	0.65 mg/ml (Lipasa 5 U/ml, Amilasa 65 U/ml y Proteasa 65 U/ml)	Porcina	4.09 mg/ml	Bovina y ovina
Icard-Vernière	1.85 mg/ml (5ml)	Porcina	11 mg/ml (5ml)	Bovina y ovina
Kruger	0.4 mg/ml (Lipasa 3.2 U/ml, Amilasa 40 U/ml y Proteasa 40 U/ml)	Porcina	2.5 mg/ml	Porcina
Oghbaei		Porcina		Porcina
Binaghi		Porcina		Porcina
Tripathi		Porcina		Porcina
Tripathi		Porcina		Porcina
Hemalatha		Porcina		Porcina
De-Regil	2.04 mg/ml (Lipasa 16 U/ml, Amilasa 202 U/ml y Proteasa 202 U/ml)	Porcina	4.24 mg/ml	Porcina
Bilal	2 mg/ml (Lipasa 16 U/ml, Amilasa 200 U/ml y Proteasa 200 U/ml)	Porcina	12.5 mg/ml	Porcina

Elaboración propia

Respecto a la duración de la fase intestinal, la mayor parte de los estudios, 59% reportan una duración de 2 horas, el 33% emplean entre 2 y media y tres horas. Dentro de las metodologías

¹ La concentración de las enzimas fue elaborada por el autor con base en la información suministrada en los artículos.

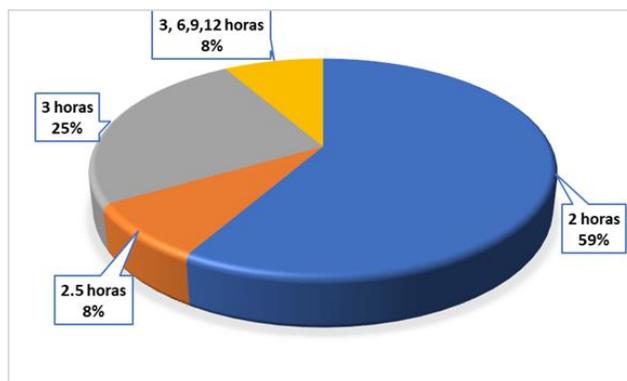
aplicadas, en uno de los estudios se reporta una duración de 12 horas, con toma de muestras a las 3, 6, 9 y 12 horas. (tabla 4-10 y gráfica 4-8)

Tabla 4-10 Tiempo de duración de la fase intestinal para cada uno de los estudios

Estudio	Duración Fase Intestinal
Tripathi, Hemalatha	3h
De-Regil	2.5 h
Rebellato, Kruger, Oghbaei, Binaghi, Wahengbam, Bryszewska, Icard-Vernière	2h
Bilal	3, 6, 9 y 12 h

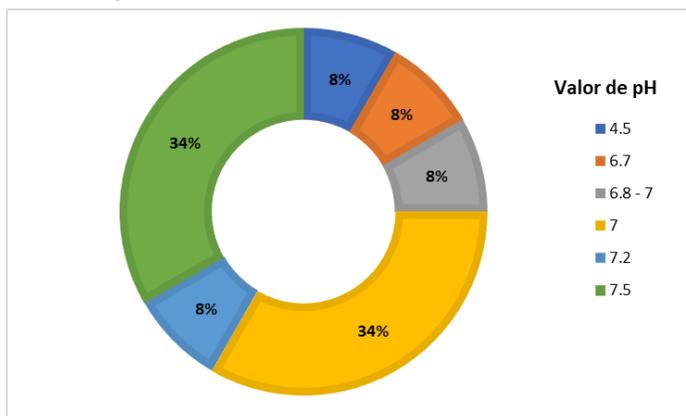
Elaboración propia

Gráfica 4-8 Duración fase intestinal en horas y distribución porcentual



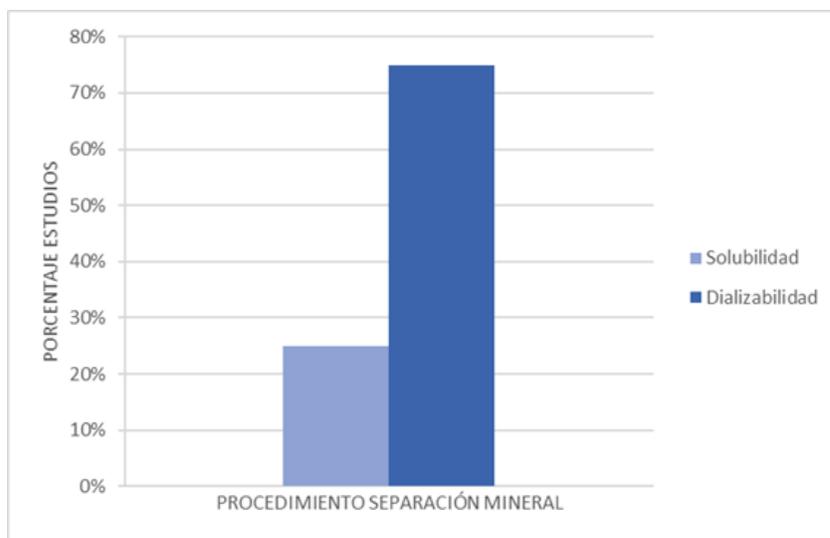
Los valores de pH para la fase intestinal, en su mayoría (76%) fluctúan entre 7 y 7.5; 3 estudios (24%) emplean pH por debajo de 7. En la gráfica (4-9) se encuentran los valores de pH, así como su distribución porcentual.

Gráfica 4-9 pH de la digestión *in vitro* Fase Intestinal



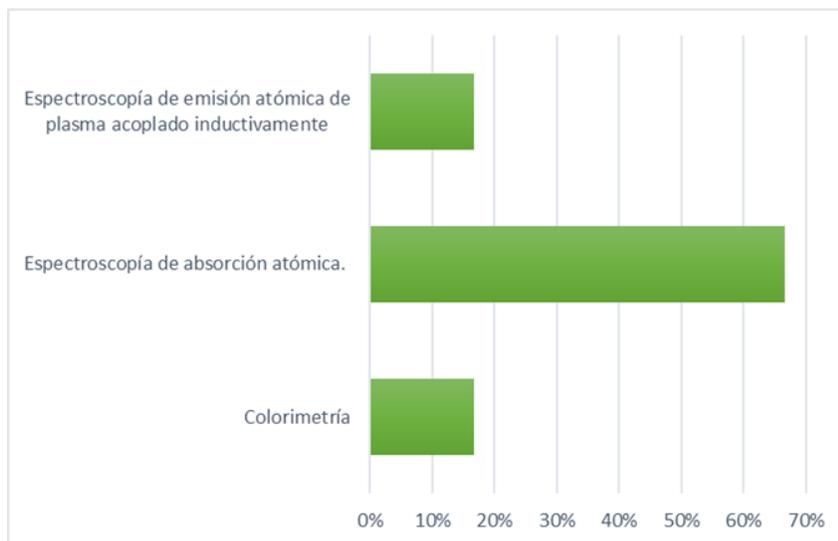
Sobre el proceso de separación del mineral bioaccesible se observa que se aplicaron dos métodos, el de solubilidad y dializabilidad. Para el primero se aplica baja temperatura a las muestras digeridas, para dar paso a la centrifugación, separando los sobrenadantes, los cuales contendrían la fracción soluble del nutriente. Este método es aplicado por Wahengbam y Bryszewska. Nueve de los autores recurrieron a la dializabilidad, que consiste en hacer pasar el material digerido por una membrana semipermeable con cantidad determinada de bicarbonato de sodio, hallándose el nutriente soluble dentro de la membrana. Rebellato aplica, tanto dializabilidad como solubilidad, con el fin de comparar los resultados obtenidos por cada uno de los dos métodos. En la gráfica (4-10) se observa la distribución porcentual de la aplicación de las técnicas mencionadas.

Gráfica 4-10 Distribución porcentual del procedimiento utilizado para separación del mineral bioaccesible.



- Métodos de determinación del mineral de interés

En la información reportada por los estudios revisados se encuentran los diferentes métodos que se utilizaron para determinar el contenido de hierro o zinc. Dentro de los mencionados métodos se encuentra: colorimetría, espectroscopia de absorción atómica y espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente. (Gráfica 4-11)

Gráfica 4-11 Métodos de determinación del mineral de interés

- Tratamiento estadístico

Los estudios analizados dan cuenta de los diferentes métodos para realizar el análisis de los datos. La elección del método de análisis depende de los objetivos planteados en la investigación, así como de las características propias de las matrices alimentarias. (Tabla 4-11)

Tabla 4-11 Tratamiento estadístico utilizado en los estudios de bioaccesibilidad

Año	Autor	Matriz Alimentaria	Compuestos para fortificación	Tratamiento estadístico
2019	Wahengbam,	Arroz parborizado fortificado y no fortificado	FeNaEDTA	Se utilizaron tres repeticiones para determinaciones analíticas. Se realizó un análisis unidireccional de la varianza para el análisis de datos y se aplicó la prueba de comparación de medias de Duncan con una probabilidad de $P = 0.05$ para determinar las diferencias entre los tratamientos utilizando IBM SPSS Statistics 20.
2019	Bryszewska	Suplementos nutricionales comerciales, sulfato y lactato ferroso encapsulado, pan y sandwich para el desayuno.	Sulfato ferroso, lactato ferroso	El análisis estadístico de los datos se realizó en lenguaje computacional R. Para las pruebas post hoc, se utilizó el paquete Agricolae. Los datos se analizaron usando un ANOVA unidireccional ($p < 0.05$) seguido de una comparación múltiple usando una prueba de Tukey, con un significado establecido en $p < 0.05$.

Resultados y discusión

Año	Autor	Matriz Alimentaria	Compuestos para fortificación	Tratamiento estadístico
2017	Rebellato	Harina de trigo integral (WWF), Panes de trigo integral (WWRB)	Sulfato ferroso monohidratado (FS), fumarato ferroso (FF), hierro reducido (RI) , ácido férrico, NaFeEDTA, sulfato ferroso microencapsulado (FSm) y fumarato ferroso microencapsulado (FFm)	Todos los datos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para la comparación de medias utilizando el software Statistica 7.0.
2016	Icard-Vernière	Pasta de maíz más salsas vegetales de hoja de amaranto y malva judía. Pasta espesa de cereal "tô" a partir de harina de maíz, la mezcla de los dos llam plato entero.	NaFeEDTA o sulfato de Fe	Los análisis se realizaron por triplicado. Se promediaron los valores. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de diferencia menos significativa de Fischer se usaron para comparar medias al nivel de significancia del 5%, utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1.
2015	Kruger, Johanita	Platos GLV (tradicionales de verduras de hoja verde) coladas de maíz fortificadas y sin fortificar, platos compuestos por verduras y colada.	Hierro electrolítico, óxido de zinc	Todos los análisis se realizaron en dos muestras preparadas individualmente, y las réplicas dependen de la precisión del método. Se utilizó Statistica 12 para analizar las diferencias significativas en los datos mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se aplicó la prueba múltiple post-hoc de Tukey para determinar diferencias significativas entre medias específicas con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$).
2012	Oghbaei,	Productos a base de mijo, fideos y obleas	Fumarato ferroso y sulfato de zinc.	Todos los análisis se realizaron por duplicado o por triplicado. La prueba t de Student se utilizó para determinar las diferencias en los nutrientes totales y bioaccesibles. Para estudiar el efecto del procesamiento, se determinaron diferencias significativas entre fideos y obleas mediante el análisis de varianza y la prueba post hoc de Tukey usando SPSS 18.0.
2011	Binaghi, Maria J	Infusiones de yerba mate y leche fortificada	El sulfato ferroso, El bisglicinato ferroso, NaFeEDTA.	El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y Test de Dunnet a posteriori con $p < 0,05$
2010	Tripathi	Mijo de sorgo (<i>Sorghum vulgare</i>) y el mijo de perla (<i>Pennisetum glaucum</i>).	Estearato de zinc, EDTA disódico y ácido cítrico.	La fortificación y las determinaciones analíticas de las harinas de mijo se realizaron de forma independiente en cinco repeticiones, y los valores se presentan como media \pm SEM de estas repeticiones. El análisis estadístico de los datos analíticos se realizó utilizando la prueba t de Student
2010	Tripathi, Bhumika	Harina de mijo "dedo"	Oxido de zinc Estearato de zinc	El análisis estadístico de los datos analíticos se realizó utilizando la prueba t de Student según Snedecor y Cochran.

Año	Autor	Matriz Alimentaria	Compuestos para fortificación	Tratamiento estadístico
2009	Hemalatha	Cereales - arroz, trigo y sorgo, y garbanzos, frijol mungo y Guandúl.	Sulfato ferroso, carbonato de calcio,	La determinación de la bioaccesibilidad de zinc y hierro en muestras de alimentos, así como todos los demás análisis químicos se llevaron a cabo en cinco réplicas. El análisis estadístico de los datos analíticos se realizó de acuerdo con Snedecor y Cochran, utilizando la prueba t de Student.
2007	Luz Maria De-Regil	Atole de maíz fortificado y pretratado.	Sulfato ferroso, fumarato ferroso y el bisglicinato ferroso quelado, cloruro férrico, citrato de amonio férrico y ácido etilendiaminotetraacético de sodio férrico quelado (NaFeEDTA).	El análisis de varianza unidireccional (ANOVA) se utilizó para evaluar el efecto de diferentes compuestos de hierro, potenciadores y contenido de ácido fítico sobre la dializabilidad del hierro y otros minerales en el atole. Cuando se encontraron diferencias, se utilizaron pruebas de Tukey o Games-Howell (para variaciones no iguales) para el análisis post hoc. Las comparaciones entre atole tratado con fitasa y sin modificar se realizaron mediante la prueba t de Student. Se establecieron asociaciones entre compuestos o minerales con la correlación de Pearson.
2002	Bilal, Rakhshanda	Harina de trigo bien molida grado 1 (extracción al 80%) para fines de fortificación	Sulfato ferroso	No refiere

▪ Resultados Globales de los Estudios

Mediante la aplicación de los diferentes procedimientos para determinar la bioaccesibilidad de los nutrientes, se lograron identificar los siguientes resultados por cada uno de los estudios (Tabla 4-11)

Tabla 4-12 Resultados generales de los estudios de bioaccesibilidad

Año	Autor	Matriz Alimentaria	Resultados bioaccesibilidad
2019	Wahengbam,	Arroz parborizado fortificado y no fortificado	*El % de bioaccesibilidad de Fe aumentó al aumentar la concentración de fortificación. *Reducción en el contenido de Fe bioaccesible cuando el tiempo de molienda del arroz se aumentó. *A mayor concentración de fortificante mayor absorción en el grano sin embargo se queda en la parte exterior del grano.
2019	Bryszewska	Suplementos nutricionales comerciales, sulfato y lactato ferroso encapsulado, pan y sándwich para el desayuno.	*Mayor contenido de hierro soluble en las preparaciones que contienen hierro encapsulado. *La bioaccesibilidad del hierro fue menor en las matrices de alimentos con suplementos que en los micro encapsulados. *Se observaron diferencias significativas en las micro encapsulados cuando se incluyó vitamina C. El agente antioxidante protegió los iones ferrosos contra la oxidación. *La encapsulación parece una forma efectiva de limitar la inmovilización de hierro por el ácido fítico y de aumentar su accesibilidad para la absorción.

Resultados y discusión

Año	Autor	Matriz Alimentaria	Resultados bioaccesibilidad
2017	Rebellato	Harina de trigo integral (WWF), Panes de trigo integral (WWRB)	<p>*El NaFeEDTA demostró ser el compuesto de hierro más efectivo en la fortificación de Harina de trigo integral, ya que presentó los niveles más altos de solubilidad y dializabilidad seguido de fumarato ferroso micro encapsulado.</p> <p>*El sulfato ferroso micro encapsulado y el hierro reducido presentaron la solubilidad más baja. La diálisis de Zn fue influenciada positivamente por NaFeEDTA, sulfato ferroso micro encapsulado y fumarato ferroso.</p>
2016	Icard-Vernière	Pasta de maíz más salsas vegetales de hoja de amaranto y malva judía. Pasta espesa de cereal "tô" a partir de harina de maíz, la mezcla de los dos: plato entero.	<p>*En las salsas de amaranto fortificadas con NaFeEDTA y sulfato de hierro se observó el porcentaje más alto de hierro dializable en comparación con la salsa sin fortificar.</p> <p>*La fracción del zinc dializable aumentó en salsas de amaranto y malva judía fortificadas con NaFeEDTA, mientras que no se modificó con sulfato de hierro.</p> <p>*La fortificación con hierro podría ser una forma eficiente de aumentar el contenido de hierro disponible en las salsas de vegetales de hojas verdes el NaFeEDTA es más efectivo que el sulfato de hierro.</p>
2015	Kruger, Johanita	Platos GLV (tradicionales de verduras de hoja verde) coladas de maíz fortificadas y sin fortificar, platos compuestos por verduras y colada.	<p>*Los platos de GLV contenían cantidades promedio de zinc, pero tenían un alto contenido de hierro y anti nutrientes.</p> <p>El bajo contenido de anti nutrientes de las gachas de maíz, condujo a mayores cantidades de hierro y zinc bioaccesibles en las comidas.</p>
2012	Oghbaei,	Productos a base de mijo, fideos y obleas	<p>*El tamizado disminuyó el contenido de nutrientes y componentes bioactivos en la harina de mijo; Sin embargo, hubo un aumento en la bioaccesibilidad de todos los componentes, lo que indica una mejor absorción.</p> <p>*Los productos preparados con harina tamizada exhibieron una mayor bioaccesibilidad de todos los nutrientes.</p> <p>*Los productos fortificados tenían una bioaccesibilidad significativamente mayor de los nutrientes respectivos.</p>
2011	Binaghi, Maria J	infusiones de yerba mate y leche fortificada	<p>*El consumo de infusiones de yerba mate no aportaría Fe.</p> <p>*Las infusiones en mezcla con leche fortificada con Fe no afectarían negativamente la disponibilidad de Fe.</p> <p>*La preparación de infusiones-cocciones con leche puede disminuir la bioaccesibilidad de Fe y Zn.</p>
2010	Tripathi	Mijo de sorgo (Sorghum vulgare) y el mijo de perla (Pennisetum glaucum).	<p>*La harina de mijo perla fortificada proporcionó una mayor cantidad de zinc bioaccesible, esto se atribuyó a la presencia de EDTA, más que al zinc fortificado.</p> <p>*El beneficio de la fortificación con zinc fue más evidente en la harina de sorgo, en comparación con la harina de mijo perla, el aumento en el contenido de zinc bioaccesible es más de 1.5 veces mayor como resultado de la fortificación.</p> <p>*Las harinas fortificadas de sorgo y mijo perla fueron estables durante el almacenamiento. Por lo tanto, parecen ser buenos candidatos para la fortificación con zinc.</p>
2010	Tripathi, Bhumika	Harina de mijo "dedo"	<p>*La inclusión de EDTA junto con la sal de zinc mejoró significativamente su bioaccesibilidad en las harinas fortificadas.</p> <p>*La inclusión de ácido cítrico junto con la sal de zinc y EDTA durante la fortificación no tuvo ningún efecto beneficioso adicional sobre la bioaccesibilidad del zinc.</p> <p>*Tanto el óxido de zinc como el estearato de zinc fueron igualmente</p>

Año	Autor	Matriz Alimentaria	Resultados bioaccesibilidad
			efectivos como fortificantes, cuando se usaron en combinación con EDTA como co-fortificante. *Las preparaciones con harinas fortificadas almacenadas no comprometieron de manera significativa en el contenido de zinc bioaccesible.
2009	Hemalatha	Cereales - arroz, trigo y sorgo, y garbanzos, frijol mungo y Guandúl.	*La presencia de cantidades moderadas de hierro exógeno no inhibió severamente la bioaccesibilidad de zinc de los granos. *Cuando los niveles de hierro exógeno correspondieron a niveles suplementarios, hubo una reducción significativa en la bioaccesibilidad de zinc de los granos. *Cantidades moderadas de calcio agregado exógenamente influyeron negativamente en la bioaccesibilidad del zinc del trigo. *La influencia negativa de tales niveles exógenos de hierro y calcio en la bioaccesibilidad del zinc se observó tanto en granos crudos como cocidos
2007	Luz Maria De-Regil	Atole de maíz fortificado y pretratado.	*La dializabilidad del hierro fue mayor con NaFeEDTA que con todos los demás compuestos de hierro. *La adición de ácido ascórbico no tuvo un efecto significativo en la diálisis de hierro, mientras que el Na ₂ EDTA la mejoró de manera significativa en atole preincubado con fitasa. * La adición de Na ₂ EDTA siempre aumentó la dializabilidad intrínseca de zinc. *El pretratamiento con fitasa generalmente aumenta la diálisis del mineral.
2002	Bilal, Rakhshanda	*Se usó harina de trigo bien molida grado 1 (extracción al 80%) para fines de fortificación	*El proceso de fermentación aumenta el porcentaje de hierro liberado debido a la acción de las fitasas. *El Nan fortificado mostró una liberación máxima de hierro, lo que confirmó que la levadura y la fermentación tienen un efecto positivo en el hierro disponible en la harina con alto contenido de fitato. *El beneficio máximo de la harina de trigo fortificada se obtendrá si se consume como productos fermentados.

Elaboración propia

4.2.4 Método estático de digestión *in vitro* propuesto por consenso internacional

Con el fin de unificar condiciones para la digestión simulada de alimentos y encontrar un consenso para un modelo de digestión, en el año 2014 la red internacional INFOGEST publica el trabajo titulado *Standardised static in vitro digestion method suitable for food* (3). Es un método de digestión que utiliza proporciones constantes de alimento con relación a los fluidos digestivos, y un pH constante para cada paso de la digestión. Con este método, los alimentos pasan por pruebas secuenciales orales, gástricas e intestinales. Los parámetros de cantidad de electrolitos, enzimas, bilis, dilución, pH y tiempo de digestión, están basados datos fisiológicos disponibles (66).

En el año 2019 la misma entidad plantea la modificación y ajuste del método, el cual se nombra como INFOGEST 2.0, que incluye cambios relacionados con fase oral y gástrica, (66) las cuales se amplían más adelante.

En este método, se propone el empleo de diferentes fluidos gástricos, los cuales están constituidos por minerales y enzimas, para cada uno de los fluidos: fluido salivar simulado (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF), basados en datos *in vivo* en humanos (66).

▪ Materiales

Los principales materiales e insumos necesarios para realizar el proceso de digestión *in vitro*: Los materiales son de calidad analítica estándar. Los productos enzimáticos, deben garantizar condiciones similares de calidad. Las actividades enzimáticas se basan en ensayos de uso común y están descritas en INFOGEST 2.0 (66).

- Agua ultra pura de tipo I
- α -amilasa salival humana
- Pepsina porcina
- Extracto gástrico de conejo para la lipasa gástrica
- Bilis bovina, o bilis porcina
- Pancreatina porcina o enzimas porcinas intestinales individuales (tripsina, quimotripsina, amilasa, lipasa y colipasa)
- $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$
- NaOH
- HCl
- KCl
- KH_2PO_4
- NaHCO_3
- NaCl
- $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
- $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$

Cada una de las fases de acuerdo con el consenso internacional requiere un tipo distinto de fluido, fluido salival simulado (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF) (tabla 4-12).

Tabla 4-13 Preparación de soluciones stock de los líquidos de digestión simulada

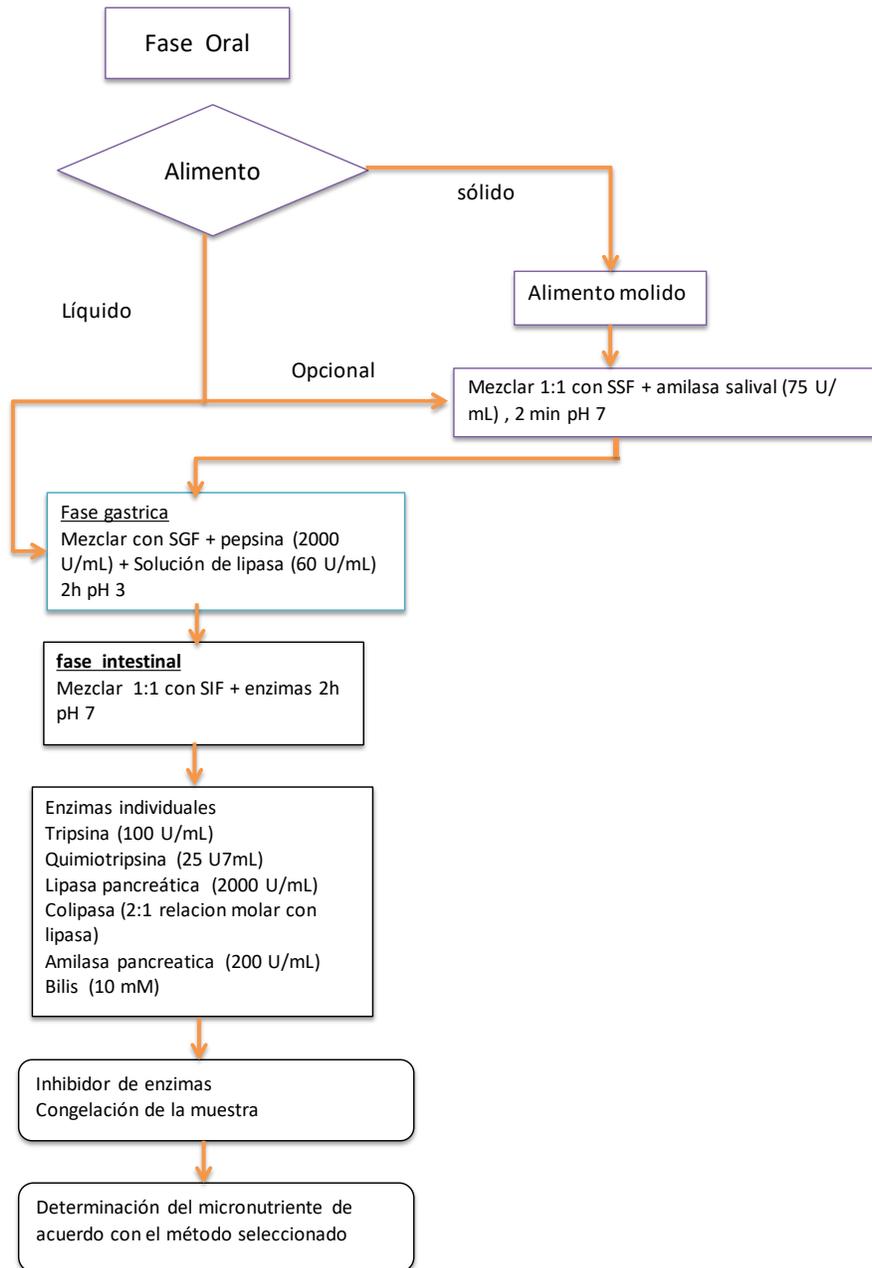
Constituyente	Conc. Solución stock		SSF		SGF		SIF	
			pH 7	Vol.	pH 3	Vol.	pH 7	Vol.
			Stock	Conc. en SSF	Stock	Conc. En SGF	Stock	Conc. En SIF
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹
KCl	37,3	0,5	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO ₃	84	1	6,8	13,6	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	2	-	-	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,15	0,4	0,1	1,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,06	0,5	0,5	-	-
Para ajuste de pH								
	mol L ⁻¹		mL	mol L ⁻¹	mL	mol L ⁻¹	mL	mol L ⁻¹
Na OH	1		-	-	-	-	-	-
HCl	6		0,09	1,1	1,3	15,6	0,7	8,4
CaCl₂(H₂O)₂ no se agrega a los fluidos de digestión simulados								
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹		mmol L ⁻¹		mmol L ⁻¹		mmol L ⁻¹
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44,1	0,3		1.5 (0.75*)		0.15 (0.075*)		0.6 (0.3*)

* Entre paréntesis está la concentración de Ca²⁺ correspondiente en la mezcla de digestión final.

Fuente: Minekus (3)

El esquema de la realización la Digestión *In Vitro*, propuesto por el consenso internacional actualizado se puede observar en la ilustración 4-2.

Ilustración 4-2 Esquema de realización de la Digestión *In Vitro*



Adaptado de Minekus (3)

Información general y diagrama de flujo de la digestión simulada en método *in vitro*. SSF, SGF y SIF son fluidos simulados salivales, gástricos e intestinales, respectivamente. La actividad enzimática está en unidades por ml de mezcla final en cada fase de la digestión, ajustado con INFOGEST 2.0

- Procedimiento

Fase Oral: La fase oral debe incluirse en todos los procedimientos de digestión simulada, independientemente del estado del alimento (líquido o sólido) para proporcionar consistencia de dilución. La fase oral implica la dilución del alimento 1: 1, con o sin amilasa salival y para sólidos o semisólidos, masticación simulada de comida. Si se usa, la exposición del alimento a la amilasa salival se limita a 2 min a pH 7. (66).

Los pasos a seguir son los siguientes: diluir los alimentos con SSF en una proporción de 1: 1 (peso / peso) para lograr un bolo con una consistencia pastosa similar a la de la pasta de tomate o la mostaza al final de la fase oral. Si la consistencia del bolo es más espesa agregar agua para lograr la consistencia adecuada. La amilasa salival es necesaria solo para digerir alimentos que contienen almidón. Puede omitirse si el alimento no lo contiene. (66)

- Mezclar los alimentos con SSF para lograr una proporción final de 1: 1 (peso / peso).
- Si es necesario, simular la masticación utilizando una picadora eléctrica o manual.
- Dependiendo del alimento, el picado se puede hacer junto con el SSF (sin enzimas).
- Adicionar la solución madre de electrolitos SSF a los alimentos, si no se hizo en el paso anterior.
- Agregar CaCl_2 (H_2O) 2 para lograr una concentración total de 1.5 mM en SSF.
- Agregar la amilasa salival, si es necesario, preparada en agua para lograr una actividad de 75 U / mL en la mezcla final.
- Agregar el agua restante para lograr una concentración 1 x de SSF.
- Incubar mezclando durante 2 min a 37 ° C

Fase gástrica: Las condiciones experimentales para el procedimiento de digestión simulada, como pH, tiempo de digestión y actividad enzimática, se basan en datos fisiológicos disponibles para una comida típica y fueron descritos y justificados en detalle en el consenso internacional previo. Para el método INFOGEST 2.0 mejorado, se recomienda el uso de lipasa gástrica (66), a continuación los pasos a seguir para esta fase:

- Precalear la solución madre de electrolitos SGF a 37 ° C.
- Agregar la solución madre de electrolitos SGF al bolo oral para lograr una proporción final de 1: 1 (vol / vol).

- Ajustar el pH a 3,0 agregando un volumen definido de HCl previamente determinado con un experimento de ajuste de prueba de pH.
- Agregar una solución de CaCl_2 (H_2O) 2 para lograr una concentración final de 0.15 mM en SGF.
- Agregar la solución de pepsina porcina preparada en agua para lograr una actividad de 2000 U / mL en la mezcla de digestión.
- Agregar la solución de lipasa gástrica preparada en agua para lograr una actividad de 60 U / mL en la mezcla de digestión.
- Verificar el pH y ajustar a 3,0 si es necesario.
- Agregar agua para lograr una concentración de SGF 1x.
- Incubar las muestras a 37 ° C, mezclando en incubadora con agitación durante 2h.

Fase intestinal: la fase intestinal comienza con la mezcla del quimo gástrico con el mismo volumen de SIF precalentado. El pH se ajusta con la cantidad de NaOH previamente calculada en la prueba de ajuste de pH. En esta fase, se dan dos opciones diferentes, el uso de pancreatina y el uso de enzimas individuales:

- Precalentar la solución madre de electrolitos SIF en un baño de agua a 37 ° C. Agregar SIF con electrolitos al quimo gástrico para lograr una relación final de 1: 1 (vol / vol).
- Ajustar el pH a 7.0 agregando un volumen definido de NaOH previamente determinado durante un experimento de ajuste de prueba de pH.
- Agregar la solución de bilis a la solución de SIF / quimo gástrico para alcanzar una concentración final de 10 mM. Colocar la solución en un mezclador de rueda giratoria a 37 ° C durante al menos 30 minutos para lograr la solubilización completa de la bilis.
- Añadir solución de CaCl_2 (H_2O) 2 para alcanzar una concentración de 0,6 mM en SIF.
- Realizar la fase intestinal con pancreatina (opción A) o con enzimas individuales (opción B).
(A) Pancreatina: agregar la suspensión de pancreatina en solución SIF para lograr una actividad de tripsina de 100 U/mL en la mezcla final. Puede ser necesaria

lipasa pancreática adicional para que la digestión de alimentos que contienen grasa alcance una actividad de lipasa de 2000 U / ml en la mezcla final.

(B) Enzimas individuales: agregar tripsina, quimotripsina, α -amilasa pancreática, lipasa pancreática y las soluciones de colipasa en SIF para alcanzar 100, 25, 200 y 2000 U / mL y colipasa en un exceso molar (relación de 2: 1 colipasa: lipasa), respectivamente, en la mezcla final de digestión.

- Verificar el pH y ajustar a 7.0 si es necesario.
- Agregar agua para lograr una concentración 1 x del SIF.
- Incubar las muestras a 37 ° C, utilizando una incubadora con agitación durante 2 h, a partir del momento en el que se agregan las enzimas pancreáticas (66).

Tal como se ha mencionado previamente, la digestión *in vitro* se lleva a cabo para una amplia gama de objetivos y también con diferentes criterios de evaluación. En todos los casos, el muestreo, la conservación de las muestras y el tratamiento posterior a la digestión son fundamentales y podrían ser necesario hacer adaptaciones según los requisitos particulares de cada estudio (66).

De acuerdo con lo anterior, después de la digestión gastrointestinal y para inhibir las diferentes actividades enzimáticas de las muestras digeridas, es necesaria una congelación instantánea inmediata después de la toma de muestras. Sin embargo, al descongelar la muestra para un análisis posterior, las actividades enzimáticas residuales podrían afectar de manera importante la estabilidad. Por lo tanto, se recomienda la adición de inhibidores enzimáticos de las enzimas digestivas diana (66).

4.3 Discusión de los resultados

A continuación, se presentarán los resultados de la evidencia de las metodologías empleadas para la estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes matrices alimentarias fortificadas y el método estático de digestión *in vitro* propuesto por consenso internacional.

Es bien conocido que la aplicación de los métodos *in vitro* para imitar los procesos de digestión es una herramienta de aproximación a las condiciones del tracto gastrointestinal, aunque es una herramienta muy valiosa tiene limitaciones, tales como la falta de movimientos naturales de la digestión, y el hecho de no poder incluir diferentes condiciones relacionadas con el

proceso digestivo que pueden presentarse en diferentes grupos poblacionales o en personas con condiciones de salud determinadas (3). Este capítulo corresponde al análisis de lo observado en los estudios sobre diferentes protocolos de métodos aplicados para determinar la accesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en diferentes alimentos fortificados.

Como ya se ha mencionado los métodos *in vitro* son ampliamente utilizados para las investigaciones en las que se pretende examinar el cambio que experimentan diferentes sustancias al ser sometidas al proceso de digestión en el organismo (3). Por lo tanto es de gran interés observar estos cambios en nutrientes esenciales para la nutrición humana, especialmente en los que se evidencian deficiencias importantes, tanto por la proporción de la población que resulta afectada, como por las consecuencias que traen dichas deficiencias, este es el caso del hierro y el zinc, los cuales se consideran vitales para el ser humano, especialmente en etapas de la vida en donde hay crecimiento y desarrollo acelerado (5).

Considerando lo anterior, con el fin de estimar la cantidad real del nutriente que es potencialmente accesible para ser absorbido por el organismo, se han planteado múltiples metodologías que buscan realizar un proceso secuencial y organizado, pretendiendo simular los pasos que se dan naturalmente en el sistema digestivo, estableciendo condiciones específicas de pH, tiempo y temperatura del medio en donde se desarrolla, haciendo adición de enzimas y otras sustancias que intervienen en el proceso (3).

Con relación a la importancia de este tema, es preciso que las investigaciones puedan ser comparables, a fin de obtener conclusiones consistentes sobre la bioaccesibilidad de nutrientes, generando recomendaciones más precisas sobre la ingesta de estos, relacionadas específicamente con los niveles de fortificación necesarios para cubrir deficiencias (3).

Dentro de este marco, para el procedimiento estandarizado de digestión *in vitro* se tienen en cuenta ciertas adaptaciones, con el fin de acoplarlo lo mejor posible a lo que sería una digestión *in vivo*. Varias de las condiciones biológicas pueden ser simuladas en el laboratorio, sin embargo, es muy difícil controlar múltiples variables dentro de la digestión, tales como la concentración de enzimas, iones, cantidad de saliva, variaciones del peristaltismo intestinal etc. (3).

En el método de consenso se plantea la utilización de soluciones electrolíticas, de acuerdo con la etapa de la digestión, salivales, gástricas e intestinales. Las cuales se nombran como: fluido salival simulado (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF). Se componen de electrolitos correspondientes a soluciones stock, enzimas, CaCl_2 y agua. Las concentraciones recomendadas de electrolitos en los fluidos simulados están basadas en datos *in vivo* en humanos (3) (57). Sin embargo, en los diferentes estudios se observa una alta variabilidad en la concentración de enzimas y adición de algunas sales. Esto puede ser debido no sólo a la naturaleza de las matrices alimentarias analizadas, especialmente a su contenido de macro y micronutrientes; sino también a los otros componentes del alimento o preparación que eventualmente pueden interferir en el proceso.

4.3.1 Fase oral:

Cabe considerar, que existen múltiples variables que intervienen en el alimento dependiendo de la fase de la digestión en la que se encuentre o se pretenda aplicar. Durante la fase oral, la salivación y la masticación conforman un proceso complejo que depende del tipo de alimento su textura y su composición. La saliva cambia su composición de acuerdo con factores externos que llevan a la estimulación de las glándulas salivares, también se ve influenciada por el volumen de comida, ciclos de masticación, fuerza de la mordida, la condición de los dientes, el nivel de hambre y los hábitos alimentarios (3)-

El medio en el que encuentran contenidas todas las sustancias que hacen parte de la etapa oral de la digestión es la saliva, la cual se produce por las glándulas salivales para ser enviada a la cavidad bucal. Proviene en su mayoría de glándulas salivales mayores, 93 % y de las menores en 7%. Se considera una secreción bastante compleja. La saliva contiene una gran variedad de electrolitos como sodio, potasio, fosfatos, magnesio calcio y bicarbonato. También inmunoglobulinas, enzimas, proteínas, mucinas y productos nitrogenados, como urea y amoníaco. Tanto los bicarbonatos y fosfatos como la urea modulan

(27) (26) (57)

Dentro de las funciones de la saliva está la de mantener y proteger la mucosa de la parte superior del tracto digestivo, mediante la lubricación; mantenimiento de la integridad de los dientes y las mucosas, acción amortiguadora y de limpieza; actividad tanto antibacteriana como y antiviral, así como la percepción del sabor, remineralización, masticación, formación del bolo alimenticio, deglución y digestión. Las proteínas como las mucinas sirven para limpiar, agregar y / o unir microorganismos orales e intervenir en el metabolismo de la placa dental; el calcio, el fosfato y las proteínas son un factor antisolubilidad, en caso necesario, al tiempo que modulan la desmineralización y remineralización; y las inmunoglobulinas, proteínas y enzimas proporcionan acción antibacteriana.

(27) (28)

Es importante recalcar que la fase oral representa una parte muy importante de la simulación *in vitro*, especialmente si se trata de alimentos sólidos, mucho más si son elaborados con base en cereales o tubérculos, debido a su alta cantidad de almidón, el cual empieza a ser hidrolizado por la amilasa salival. Cabe anotar que en la actualización que se realizó al consenso internacional en el año 2019, se contempla que la fase oral debe incluirse en todos los procedimientos de digestión simulada, independientemente del estado del alimento (líquido o sólido) para proporcionar consistencia de dilución. Sin embargo, también se plantea que pueda realizarse la dilución del alimento en el líquido salival simulado (SSF) sin utilizar la enzima, esto en el caso de que el alimento a analizar no contenga almidón. La fase oral implica la dilución del alimento 1: 1 (peso / peso) con líquido salival simulado (SSF), con o sin amilasa salival, y para sólidos o semisólidos, masticación simulada de comida. Si se usa, la exposición del alimento a la amilasa salival se limita a 2 min a pH 7 (66).

Para el proceso digestivo la principal enzima de la saliva es la alfa-amilasa: su función es la digestión bucal del almidón de los alimentos. Cataliza la ruptura de los enlaces polimerizantes a (1-4), desempeñando un papel importante en la nutrición. Para una adecuada actividad la α -amilasa salival (ptialina), necesita un pH de alrededor de 6.8. Su actividad está limitada a la cavidad bucal cuando el pH puede ser alto como consecuencia de la capacidad tampón de los alimentos. La capacidad de la α -amilasa disminuye en la etapa gástrica temprana debido al medio ácido y la actividad proteolítica en el estómago.

(26) (3)

Como ya se mencionó previamente, solamente tres de los estudios revisados aplicaron la fase oral de la digestión, Wahengbam et. al. (54), quien empleo una matriz de arroz parbolizado fortificado y no fortificado, Icard-Vernière et. al. (57), quien utilizó pastas de cereales con salsas a base de vegetales y Binaghi et. al. (60) que trabajó con infusiones de yerba mate y leche fortificada; el tratamiento preliminar de estas matrices, tabla 4-2, y 4-5, consistió en la liofilización y pulverización para el arroz parbolizado, homogenización para el caso de vegetales y las infusiones con yerba mate, haciendo una alusión a la etapa de masticación y formación del bolo. En el consenso internacional actualizado se hace énfasis en la preparación previa de los alimentos para la digestión *in vitro*, mencionando que estos deben disponerse de manera que se refleje su situación real, por ejemplo, dilución, emulsificación, integración con otros alimentos, etc. Los alimentos con alto contenido de sólidos, como los polvos, deben reconstituirse en líquidos de manera cómo se consumen (66).

En lo que respecta al consenso de metodología para digestión *in vitro*, se indica la adición de α -amilasa salival humana (EC 3.2.1.1) para conseguir 75 U / ml en la mezcla final, sin embargo en los estudios que realizan la fase oral, solo Wahengbam (54) emplea una actividad enzimática de 25 U/ml, para los demás estudios no se define como tal la actividad de la enzima. El hecho de no contar con condiciones estándar de concentración de enzima dificulta realizar comparaciones sobre los resultados obtenidos.

Una situación similar se presenta con respecto a la composición del contenido oral, por lo que se sugiere que una concentración final de los alimentos para SSF de 50:50 (w / v) o (v/v) para alimentos líquidos en los que se recomienda la aplicación de la fase oral, para todos los alimentos (sólidos y líquidos) (66).

En los estudios revisados no se hace mención del uso como tal de fluidos simulados con concentraciones determinadas de electrolitos, por lo tanto, al no utilizar los mencionados electrolitos podría dificultarse un ajuste adecuado del pH (pH.7), e interferir de alguna manera en la actividad enzimática como parte fundamental del proceso de digestión *in vitro* (3). Se destaca el trabajo de Wahengbam (54) en el año 2019, quien es el único que reporta la adición de NaCl, KCl y CaCl₂ en la etapa oral, lo mismo que CaCl₂ en la intestinal.

Vale la pena aclarar que el KCl, se contempla en el fluido salival dentro del consenso, NaCl en el fluido gástrico e intestinal y CaCl₂, en los tres tipos de fluido, sin embargo, este último no se añade a las soluciones de electrolitos porque puede producirse precipitación. En lugar de ello, se añade a la mezcla final del líquido de digestión simulada y alimento (3). Mediante la adición de electrolitos en la digestión *in vitro* se logra una mayor similitud al consenso propuesto para replicar las condiciones *in vivo*.

En ninguno de los estudios mencionados se informa sobre el pH de la fase oral, el cual es de 7 en el consenso. Por otro lado, existe una discrepancia en los tiempos de incubación de la α -amilasa (2 minutos, 5 minutos y 30 minutos respectivamente). Estas diferencias de tiempo podrían estar relacionadas con la complejidad de la matriz alimentaria para el caso del estudio de Icard-Vernière, (57) (5 minutos), por tratarse de un plato mixto conformado por cereales y verduras. Sin embargo esto no aplicaría para Binaghi, (60) que utiliza un tiempo de incubación de 30 minutos para una matriz líquida de infusiones y leche que no contiene almidón, por lo tanto la amilasa salival no tendría una acción tan importante, además en condiciones normales la masticación es un proceso corto, por lo que se considera que la aplicación de la fase oral por más de 5 minutos no correspondería a las condiciones normales *in vivo*.

En general, las investigaciones sobre bioaccesibilidad no emplean comúnmente la fase oral, la cual se considera importante dentro del protocolo. No solo por la acción que tiene la amilasa sobre los carbohidratos, sino por el contenido electrolítico que facilita el mantenimiento del pH y la consistencia en la dilución del alimento en cada una de las fases (66).

4.3.2 Fase gástrica:

Durante la fase gástrica existe un objetivo claro, el cual es reunir y contener el alimento dentro del estómago, así como disponerlo de manera gradual para ser recibido de forma adecuada

por el duodeno (22). Se han definido aproximaciones de los rangos de pH y los tiempos en los que se lleva a cabo este proceso en el sistema digestivo humano. Como se ha venido diciendo, la idea es tener condiciones estandarizadas para hacer reproducibles los experimentos y comparables los resultados de los mismos. La fase gástrica tiene ciertas particularidades que son relativamente más sencillas que las de la fase oral. Tanto los tiempos de tránsito como el volumen de la secreción gástrica dependen del tipo de alimento (3).

Para la etapa gástrica se establece el uso de una solución electrolítica especial, donde las concentraciones de los iones varían ligeramente con respecto a la fase oral. La solución electrolítica trata de simular un medio propicio para las enzimas y de las condiciones biológicas de una digestión real (tabla 4-12). A partir de aquí, se plantea agregar la solución madre de electrolitos SGF al bolo oral para lograr una proporción final de 1: 1 (vol / vol) (66). En las investigaciones revisadas no se encontró referencia a la utilización de fluido gástrico estandarizado tal como se plantea en el consenso, se puede apreciar que la adición de enzimas se realiza en soluciones de HCl utilizadas para mantener el pH y conservar un medio líquido similar al fluido gástrico que propicie la acción de las enzimas sobre las matrices alimentarias a estudio.

Respecto a las enzimas gástricas utilizadas para esta fase, en el consenso internacional actualizado, se hace referencia a dos enzimas: pepsina porcina (EC 3.4.23.1) la cual se añade hasta alcanzar 2.000 U/mL en la mezcla de digestión final y la lipasa gástrica preparada en agua para lograr una actividad de 60 U / mL en la mezcla de digestión, además de agregar una solución de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ para lograr una concentración final de 0.15 mM en SGF. La inclusión de la lipasa gástrica, se realiza con el fin de simular la hidrólisis de las grasas a nivel gástrico, la cual se constituye en un potenciador de la acción de la lipasa pancreática (66).

En los trabajos revisados la enzima empleada de manera general es la pepsina de origen porcino, sin embargo, se encuentran reportados diferentes niveles de actividad de la misma, los cuales varían desde 45 U/ml hasta valores cercanos a 3700 U/ml, por lo que es claro que las condiciones de aplicación de la digestión *in vitro* tienen una variabilidad muy alta.

El estudio que muestra la actividad más alta de la pepsina es el de Bilal (65), quien trabajó con preparaciones de harina de trigo fortificado, aunque no reporta el contenido de proteína

de la matriz, este pudo haber sido un factor determinante en la escogencia de la actividad de la enzima. El valor más bajo es el de la investigación de Bryszewska, quien trabajó con suplementos nutricionales aplicados a panificados, el más cercano al consenso es el valor reportado por autores como Kruger y Tripathi entre otros, quienes trabajaron con comidas compuestas y mijo respectivamente. En los estudios revisados no se hace referencia a la utilización de la lipasa gástrica, la cual fue incluida en la actualización del consenso en el año 2019.

La pepsina es la primera enzima en actuar sobre las proteínas, especialmente en la zona media de las cadenas peptídicas, en los enlaces hidrófobos en los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, presentes en la gran mayoría de las proteínas provenientes de los alimentos. Puede afirmarse que es la única enzima proteolítica en el estómago, convierte las proteínas en peptonas y proteasas. El pepsinógeno es su precursor inactivo, el cual es transformado en pepsina activa por el ácido clorhídrico. El contenido de pepsina en el estómago varía con las personas, sin embargo, aumenta principalmente en la digestión de 0,26 (30 min) a 0,58 mg/ mL (180 min). En los trabajos de investigación lo más comúnmente utilizado es la pepsina porcina, esto debido a que existe una alta similitud entre pepsinas humanas y porcinas (84%), además del bajo costo de la pepsina porcina que se extrae a partir de mucosa gástrica, lo que la hace de uso regular en los modelos estáticos de digestión *in vitro*

(31) (32)

Referente al pH se considera que después de ingerir alimentos, por lo general aumenta el pH hasta un valor de 5 o mayor, por la capacidad buffer de una dieta tipo occidental. La secreción de ácido clorhídrico reduce el pH a los valores requeridos para que exista actividad enzimática adecuada. Se requieren condiciones ácidas para la actividad que la pepsina, principalmente entre pH 2 y 4. Por lo tanto se recomienda un valor estático de pH 3.

La actividad catalítica de varias enzimas depende de la presencia de cofactores, que se definen como la fracción no proteínica de una enzima, la cual es necesaria para su activación completa. Dentro de los cofactores se encuentran los activadores metálicos, los cuales son cationes monos y bivalentes como K, Mn, Mg, Ca y Zn y pueden tener diferentes tipos de unión a la enzima ya sea de manera firme o débil. La actividad de enzimas como la lipasa puede estar afectada de diferentes formas por la presencia de iones metálicos en la preparación, ellos pueden estabilizar o desestabilizar la estructura de las enzimas en solución. Muchas lipasas necesitan del ion Ca^{2+} para conservar una conformación estable y/o mantener su competencia.

(27) (67) (31)

Igualmente se sugiere determinar la cantidad de ácido requerida para mantener este pH mediante un experimento prueba antes de la digestión, facilitando la continuidad del proceso (3).

Para las investigaciones revisadas, el 100% de las mismas dentro de sus procedimientos utilizaron condiciones gástricas de pH 2, ajustadas con soluciones concentradas de HCl (generalmente 6M). En el caso de la temperatura, igualmente todas las investigaciones mantuvieron un valor de 37 °C. Sin embargo, se observó variabilidad en el tiempo aplicado para esta etapa, el cual va desde 1 hora, hasta 3 horas. En su mayoría (75%) se manejan dos horas para su aplicación. En el consenso se aclara que las condiciones del protocolo pueden aplicarse a una gama amplia de alimentos, por lo tanto y considerando el establecimiento de condiciones estándar, se recomienda un tiempo de dos horas para la digestión gástrica (3).

En general para la etapa gástrica existen variaciones en la concentración de la pepsina, lo que puede estar relacionado con la composición del alimento, además hay variación en el tiempo de aplicación, sin embargo, el consenso internacional recomienda la uniformidad en este parámetro.

4.3.3 Fase intestinal:

Cuando se ha completado la fase gástrica de la digestión, el paso subsiguiente es la simulación de la digestión del intestino delgado. Este proceso denota un vaciamiento gradual desde el estómago hasta el intestino, lo que permite que haya una mezcla con las enzimas y sales biliares y un aumento en el pH debido en gran medida a la presencia de lipasas, amilasas y proteasas pancreáticas principalmente, para poder cumplir su función dentro del metabolismo intestinal (44).

Al igual que con las dos etapas anteriores el consenso plantea la utilización de un fluido, en este caso intestinal (SIF), el cual no difiere en gran medida con el gástrico, excepto por la diferencia en la concentración de algunas sales. Igualmente, este fluido se constituye en el medio idóneo para que se desarrolle la actividad enzimática. Con respecto a la etapa intestinal, se plantea precalentar la solución madre de electrolitos SIF en un baño de agua a 37 ° C.

Agregar SIF con electrolitos al quimo gástrico para lograr una relación final de 1: 1 (vol / vol) (3).

Con referencia a los estudios revisados, solamente Wahengbam reporta la adición de CaCl_2 en la etapa intestinal, alcanzando la concentración de esta sal referenciada en el consenso. Para los demás estudios se refiere la adición de enzima en solución de bicarbonato, que también realizaría la función de mantener el pH y servir como medio para que sucedan las reacciones enzimáticas.

Sobre las enzimas, el consenso plantea el uso de la pancreatina porcina que se encuentra disponible y contiene todas las enzimas pancreáticas importantes en diferentes cantidades. Sin embargo, para efectos de generar un procedimiento estandarizado la recomendación es basar la cantidad añadida en la actividad de una enzima específica, la tripsina. Entonces, la recomendación es que la pancreatina debe proporcionar 100 unidades TAME (p-tolu eno-sulfonil-L-arginina metil éster) por mL de contenido de fase intestinal (100 U/ml). Estos ensayos deben realizarse previamente para determinar la cantidad de tripsina a utilizar en el ensayo (3).

Con el fin de ampliar la información sobre la pancreatina, es necesario aclarar que es una mezcla de diferentes enzimas digestivas producidas por las células exocrinas del páncreas porcino. La pancreatina es una proteasa de amplio espectro, compuesta por amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasa. Se utiliza de manera especial para el análisis de digestibilidad *in vitro*, debido a que esta combinación de enzimas le permite hidrolizar proteínas, almidón y grasas (68). La pancreatina contiene adicional a las enzimas, una cantidad significativa de sales, siendo las de calcio unas de las más importantes.

Con relación a esto pudo observarse que las especificaciones de las enzimas que se encuentran contenidas en la pancreatina están reportadas como actividad de lipasa, amilasa y proteasa, tal como se presenta la tabla 4-9. Por lo tanto, no es posible realizar una comparación con el consenso. Todos los estudios reportaron que la pancreatina era de origen porcino, con una alta variabilidad desde 0.04 mg/ml hasta 2.04 mg/ml. La concentración más alta de pancreatina se da en el estudio de De-Regil, quien trabajó con atole de maíz y la más baja para Bryszewska, su investigación se desarrolló en complementos nutricionales aplicados a panificados. Por su parte, la cantidad de bilis también presentó una gran variabilidad, con

valores desde 0.25 a 12.5 mg/ml, el más bajo para Bryszewska y el más alto para Bilal, quien trabajó con derivados de trigo con o sin fortificar. En las investigaciones revisadas la mayoría es de origen porcino (75%) aunque también se reportó de origen bovino (17%). La más utilizada es la porcina, porque es muy similar a la humana, y se prefiere al presentar un mejor desempeño.

Sobre las características de la bilis, es una solución constituida por electrólitos, en su mayoría Na^+ , K^+ , Cl^- y HCO_3^- y otros minerales como el Ca^{2+} , y un componente orgánico que lo forman los ácidos biliares (65%), fosfolípidos (lecitinas) (20%), colesterol (4%), proteínas (5%) (40). Además, contiene mucina, que actúa principalmente sobre las grasas de los alimentos parcialmente digeridos preparándolos para la acción del jugo pancreático. Igualmente facilita la formación de las «micelas» ampliando la superficie de exposición para la acción de las enzimas pancreáticas. También neutraliza el producto ácido que le llega del estómago, gracias a su contenido en bicarbonato (25). Ayuda en la emulsificación y absorción de la grasa, activa la lipasa pancreática y previene la putrefacción (31).

Respecto a las demás condiciones de realización de la digestión *in vitro*, referente al pH, se encuentra que cuando el bolo digestivo pasa al intestino este se neutraliza por acción del bicarbonato hasta un valor de 6.5 y posteriormente llega a un pH de 7.5 en el íleon distal. Para mantener unas condiciones estáticas, se establece un pH de 7.0, el cual se logra con la adición de NaOH 1M. (3)

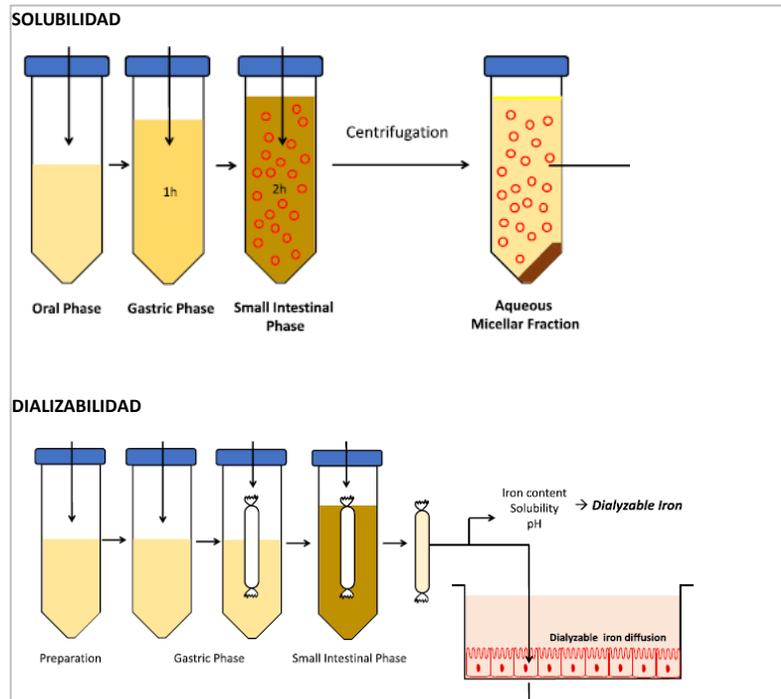
En las investigaciones se reportó un pH que presenta también cierta variabilidad, el 75% de los estudios reporta un pH igual o mayor a 7, el 17% entre 6.7 y 7 y el 18% con un pH de 4.5, el cual se considera bajo con relación a lo recomendado por el consenso y que no permitiría la acción adecuada de las enzimas pancreáticas.

En lo referente al tiempo, lo recomendado es que se realice la incubación por 2 horas a 37°C y con agitación constante (66). Sin embargo, también se presenta cierta variabilidad, encontrándose para el 59% (2) horas, 25% (3) horas, 8% (2.5) horas y 8% 3, 6,9 y 12 horas. Este último caso corresponde a Bilal, quien realizó la medición del mineral dializable en los mencionados lapsos de tiempo, e incluyó la variable de fermentación dentro de la digestión intestinal.

Para continuar la digestión *in vitro*, se utilizaron diferentes métodos para realizar la separación de la fracción accesible del mineral, es decir la cantidad que está disponible para ser absorbida por el intestino. Por esta razón se plantea el uso de sistemas de diálisis con el fin de simular la permeabilidad del intestino, para lo cual se utilizan bolsas de diálisis que contienen agua desionizada con cierta cantidad de NaHCO_3 equivalente a la acidez titulable del digerido gástrico (previamente determinada hasta pH 7.5 con NaOH). Las bolsas se colocan junto con el digerido gástrico y la solución de pancreatina y sales biliares, la incubación se realiza por 2 horas y a una temperatura de 37°C. Luego se lavan las bolsas de diálisis y de allí se obtiene la fracción dializable, la fracción soluble y la insoluble (52).

De acuerdo con lo anterior, una de las técnicas *in vitro* que puede ser utilizada como un estimador de la disponibilidad o bioaccesibilidad es la dializabilidad de un mineral en particular. Esta es la proporción de un elemento que se difunde a través de una membrana semipermeable en la simulación de digestión gastrointestinal, posterior a un período de tiempo que permitiría llegar al equilibrio la dializabilidad, depende del tamaño de la molécula, se considera que el nutriente que logre pasar a través de la membrana tendrá una alta probabilidad de ser aprovechado por el cuerpo humano (69).

Los métodos de estudio de bioaccesibilidad *in vitro* (solubilidad y diálisis) únicamente miden la primera etapa en el proceso, es decir, la solubilidad del compuesto objeto de estudio, requisito previo para su posterior absorción, o bien información relativa a la fracción del componente soluble potencialmente disponible para la absorción, que tiene un tamaño inferior al de poro de la membrana de diálisis utilizada. A pesar de esta limitación, los estudios de bioaccesibilidad suministran información útil para establecer comparaciones entre alimentos (70) (71).

Ilustración 4-3 Representación gráfica de solubilidad y dializabilidad

Fuente Ferruzzi (72)

Con respecto a los estudios, el 75% utilizó la dializabilidad como método para realizar la separación de las fracciones bioaccesibles, utilizando la difusión a través de membranas semipermeables. También se ha considerado que el proceso de difusión tiene la característica de lograr un cambio de pH gradual en el medio, lo que correspondería de manera más real a la situación *in vivo* del intestino (71).

Para la determinación de la cantidad de mineral que se encuentra en la muestra, la más utilizada es la espectroscopia de absorción atómica, espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente y colorimetría. Por su parte la espectroscopia de absorción atómica (EAA) es una técnica simple y ampliamente utilizada para la determinación de metales (73). La cuantificación de la espectroscopia de absorción atómica se basa en la medición de la cantidad de especies absorbentes producidas en una longitud de onda analítica específica (74).

Sobre los resultados globales de los estudios, se observa que la aplicación de la digestión *in vitro* fue la base para calcular la bioaccesibilidad tanto de hierro como de zinc, en diferentes matrices alimentarias y utilizando diferentes compuestos para fortificación. Se considera la

bioaccesibilidad como un concepto clave para determinar la eficiencia nutricional tanto de los alimentos naturales, como de los productos alimenticios que se desarrollan para mejorar la salud humana. La medición de la bioaccesibilidad da una idea más real de la cantidad de los nutrientes que están disponibles para ser aprovechados por el organismo y que dependen de varios factores como el tipo de matriz alimentaria. En lo referente a la estimación del hierro disponible, la dializabilidad es un indicador de la biodisponibilidad potencial, que se obtiene a través de un método *in vitro* que incluye la digestión enzimática en condiciones que simulan las fisiológicas (38).

En los resultados presentados, en granos como el arroz parborizado el porcentaje de bioaccesibilidad del hierro aumentó al aumentar en la concentración de fortificación, mientras que se redujo el hierro bioaccesible al aumentar el tiempo de molienda del arroz, probablemente debido a que el fortificante se queda en la superficie del grano (54).

Se encontró en general mayor bioaccesibilidad en hierro encapsulado en matrices como pan y sándwich para desayuno. Se observaron diferencias significativas en los micro encapsulados cuando se incluyó vitamina C, el agente antioxidante protegió los iones ferrosos contra la oxidación. Al respecto la encapsulación parece una forma efectiva de limitar la inmovilización de hierro por el ácido fítico y de aumentar su accesibilidad para la absorción en el intestino. La técnica de la encapsulación busca que el componente de interés se mantenga dentro de una matriz que lo rodea buscando una liberación dirigida y controlada, previniendo el deterioro de características como el color y mejorando la disponibilidad de minerales, especialmente en fortificación múltiple (75).

Se observa también que, para la harina y los panes de trigo integral, el NaFeEDTA demostró ser el compuesto de hierro más efectivo en la fortificación, ya que presentó los niveles más altos de solubilidad y dializabilidad seguido del fumarato ferroso micro encapsulado. En cereales como el mijo y sus derivados existen también niveles altos de solubilidad para este compuesto. El EDTA se utiliza como agente quelante para los metales, debido a que la mayor ventaja del proceso de fortificación radica en su capacidad de evitar que el hierro se una a los fitatos, presentes en gran cantidad en cereales y leguminosas (76).

En los platos mixtos como el de pastas de maíz con salsas vegetales de hoja de amaranto, se evidenció que las salsas fortificadas con NaFeEDTA y sulfato ferroso tienen un porcentaje

más alto de hierro dializable en comparación con la salsa sin fortificar. Se concluye que la fortificación con hierro podría ser una forma eficiente de aumentar el contenido de hierro disponible en los mencionados platos, el NaFeEDTA es más efectivo que el sulfato ferroso, como ya se mencionó. Se ha podido evidenciar alta disponibilidad en EDTA, cuando se utiliza en alimentos con alto contenido de fitatos, como las hojas verdes. Sin embargo, una de sus limitantes es el costo, en comparación con compuestos como el sulfato ferroso (45). La misma tendencia puede evidenciarse en otros platos mixtos, que contienen derivados de cereales y hojas verdes.

En productos a base de cereales como el mijo, el tamizado disminuyó el contenido de nutrientes y componentes bioactivos en la harina, sin embargo, reporta que hubo un aumento en la accesibilidad de todos los componentes, lo que a la larga indicaría una mejor absorción. Se ha observado que a través de la molienda se elimina aproximadamente el 90% del ácido fítico de los cereales, sin embargo, el 10% restante es un inhibidor potente. Por medio de procesos tradicionales como el remojo, la germinación y fermentación, es posible activar las fitasas naturales de los alimentos (41). Esto fue evidenciado también en los trabajos que se realizaron con harina de trigo sometida a proceso de fermentación, en donde se aumenta el porcentaje de hierro liberado debido a la acción de las fitasas, y se observa que la levadura y la fermentación tienen un efecto positivo en el hierro disponible en la harina con alto contenido de fitato (65).

4.3.4 Análisis estadístico de los datos

Considerando todas las variaciones que se observan en los diferentes estudios analizados, se hace necesaria la elección de una metodología de análisis de datos que permita establecer la influencia de cada una de las variables en los resultados de bioaccesibilidad. De acuerdo con lo reportado en los estudios, se realizan desde dos hasta cinco repeticiones para las determinaciones analíticas. Igualmente se emplea en la mayoría de los casos el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) y la aplicación de pruebas de comparación como Duncan para determinar las diferencias entre los tratamientos ($p \leq 0.05$), también es utilizada la prueba de Tukey y el test de Dunnet. La prueba t de Student se utilizó para determinar las diferencias en los nutrientes totales y bioaccesibles. Como herramientas para el procesamiento de los datos se utilizaron diferentes paquetes estadísticos como SPSS, R, Statgraphics y Statistica

Resultados y discusión

Los diferentes autores estudiaron diversas variables como la matriz, tratamientos aplicados a ella y los tipos de sal entre otros, por ello usaron análisis más amplios con el fin de incluir todas las variables mencionadas y observar la interrelación entre ellas.

5 Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en mezclas vegetales

Posterior a la revisión y análisis realizado sobre las metodologías aplicadas para la estimación de la bioaccesibilidad en diferentes alimentos fortificados, se realiza una propuesta para la estimación de la bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en mezclas vegetales, específicamente en la mezcla vegetal que el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) desarrollo y tiene a su cargo que se denomina “Bienestarina”, considerando su importancia como alimento de alto valor nutricional, que hace parte de los programas de complementación alimentaria del estado y que sirve como vehículo para fortificación de nutrientes deficitarios para la población objetivo.

5.1 Estrategias para el control de las carencias de micronutrientes

Debido a que el problema de la deficiencia de micronutrientes es multicausal, que puede estar asociada o no al consumo de alimentos fuente, se han planteado diversas estrategias que impactarían en diferentes ámbitos, especialmente a la población más susceptible de sufrir enfermedades o daños por carencia (Tabla 5-1).

Tabla 5-1 Estrategias para el control de las carencias de micronutrientes

Nombre	Definición
Diversificación de la Alimentación	Se debe buscar que las personas consuman una diversidad de alimentos para contar con las cantidades requeridas de todos los micronutrientes esenciales.
Suplementación	Se refiere al suministro de dosis relativamente altas de micronutrientes, usualmente como medicamentos.
Fortalecimiento de Acciones Prioritarias	Se encuentra el control de infecciones (vacunación y desparasitación), el mejoramiento de agua y saneamiento básico.
Fortificación voluntaria	Impulsada por el mercado, las empresas productoras de alimentos.
Fortificación de alimentos	Adición de micronutrientes a: *Alimentos procesados * Enriquecimiento o fortificación masiva *Fortificación de alimentos específicos: ACF.

Fuente Ministerio de Salud (77)

En concordancia con lo que se evidencia en los estudios poblacionales, se plantea la necesidad de intervenciones específicas que puedan realizarse de manera inmediata con el fin de disminuir los riesgos y las consecuencias asociadas a la carencia de micronutrientes como la fortificación de alimentos y dentro de las diferentes modalidades la correspondientes al desarrollo y suministro de alimentos complementarios fortificados-ACF (77).

5.2 Alimentos complementarios fortificados en Colombia

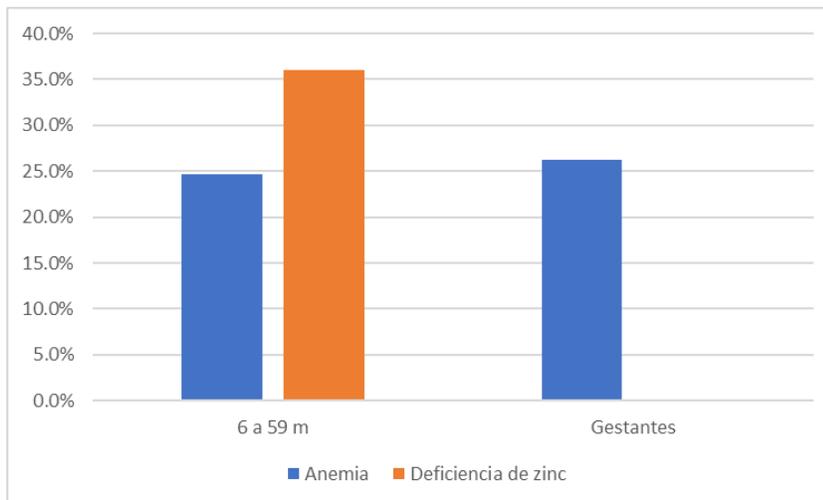
Las mezclas vegetales (ACF) se constituyen en vehículos para la fortificación con micronutrientes prioritarios para la población; están compuestas por mezclas de harinas de cereales y leguminosas, a las cuales se les agrega un preparado o mezcla de micronutrientes que puede variar con las necesidades específicas de cada grupo y la prioridad que se establezca según la deficiencia, de acuerdo con los estudios epidemiológicos (77). A continuación, se presenta un breve contexto de la situación nutricional de la población colombiana con relación al estado del hierro y del zinc en la

población menor de 5 años, dos nutrientes prioritarios en esos grupos de edad y en la cual se centró la propuesta del modelo *in vitro*.

5.2.1 Prevalencia de deficiencia de hierro y zinc en la población colombiana

El estado nutricional de una población, tiene una relación directa con su desarrollo integral, rendimiento físico, capacidad intelectual, resistencia a enfermedades, estado síquico y desempeño social (78). Los efectos más perjudiciales de la desnutrición se ven en el embarazo y los dos primeros años de vida. La deficiencia de vitaminas y minerales es la causa del “hambre oculta”, con gran impacto en la población, está relacionada con las diversas funciones que tienen estos nutrientes en organismo. En Colombia, según la ENSIN 2015, la desnutrición por carencia de micronutrientes es un problema de salud pública. La cuarta parte de los niños y niñas en edad preescolar presentó anemia, (niveles de hemoglobina inferiores al punto de corte para el grupo de edad) con una prevalencia nacional de para el 2015 de 24,7% (Gráfica 5-1), la prevalencia de anemia para el grupo de 6 a 11 meses de edad es del 62,5 % y duplica la encontrada en niños de un año (Gráfica 5-2) (5).

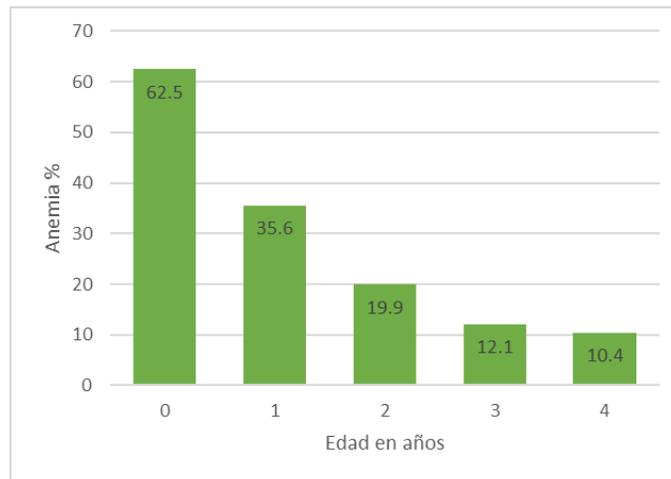
Gráfica 5-1 Prevalencia de anemia y deficiencia de zinc en población menor de 5 años y mujeres gestantes



Fuente ENSIN 2015 (5)

Las prevalencias de anemia disminuyen a medida que aumenta la edad, lo que determinaría que en los primeros tres años de vida existe una mayor probabilidad de presentarla y por consiguiente de sufrir las consecuencias asociadas a ella (79).

Gráfica 5-2 Prevalencia de anemia por edad en años en población menor de 5 años



Fuente ENSIN 2015 (5)

Por otra parte, el 36,0 % de la población infantil de 1 a 4 años en Colombia presentó deficiencia de zinc (Gráfica 5-1) 7,3 p.p. por debajo de lo reportado en la ENSIN 2010. Sin embargo, la prevalencia es mayor a la reportada en la región, cercana al 10% y a nivel global del 18 %. Aun cuando la prevalencia de deficiencia de zinc ha disminuido, continúa siendo un grave problema de salud pública en Colombia, uno de cada tres niños y niñas presenta deficiencia de zinc (5).

5.2.2 Mezcla vegetal: La Bienestarina

La Bienestarina hace parte de los alimentos complementarios fortificados (80). Su composición es a base de mezclas vegetales (cereales y leguminosas) con o sin adición de leche en polvo, a los cuales se les agrega un preparado o mezcla de micronutrientes que puede variar de acuerdo con las necesidades nutricionales específicas de cada grupo. El maíz y el trigo se utilizan como ingredientes fuente de carbohidratos y la harina de soya y la leche en polvo como fuente de proteína. Estos alimentos han sido los más utilizados para los programas de alimentación complementaria y situaciones de emergencia (81).

Como parte de su caracterización y por ser el producto hacia el cual está orientada la propuesta, se abordarán aspectos relacionados con sus componentes, composición química y premezcla de vitaminas y minerales.

- Ingredientes utilizados en la fabricación de la Bienestarina:

Los ingredientes utilizados se encuentran a continuación Tabla 5-2

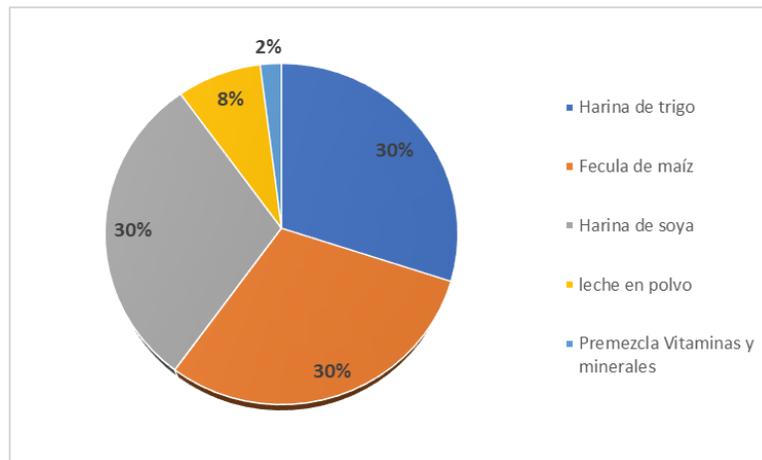
Tabla 5-2 Características de los ingredientes utilizados en la fabricación de Bienestarina

Alimento	Característica	Porcentaje
Harina de trigo	Principal producto obtenido de la molienda y cernido, del endospermo y capas internas del pericarpio de granos de trigo común <i>Triticum aestivum</i> L., o trigo ramificado, <i>Triticum compactum</i> Host., o mezcla de ellos, con el fin de obtener un tamaño de partícula determinado. Con un contenido mínimo de proteína del 7 %. (NTC 267)	30
Fécula de maíz	Producto obtenido por molienda húmeda del grano de maíz, químicamente es un carbohidrato exento de sustancias tóxicas o nocivas. Debe presentarse en forma de polvo fino blanco libre de partículas negras, suciedad u otras impurezas visibles. Su contenido de proteína varía de 0 a 0.4. (NTC 926)	30
Harina de soya	Productos alimenticios obtenidos de la soya mediante la reducción o eliminación de algunos de los principales constituyentes no proteínicos (agua, aceite almidón y otros carbohidratos) de forma que se obtiene un contenido proteico de 50 por ciento o más y menos de 65 por ciento. (NTC 2457)	30
Leche en polvo	Es el producto que se obtiene por la eliminación del agua de constitución de la leche higienizada. El contenido de grasa y/o proteínas puede ser ajustados para cumplir con los requisitos de la norma mediante la adición o retiro de constituyentes lácteos de tal manera que no se altere la relación entre proteína de suero y caseína de la leche usada como materia prima. (NTC 1036, Decreto 616 de 2006)	8
Premezcla Vitaminas y minerales	Fosfato tricálcico, hierro aminoquelado, vitamina C, zinc aminoquelado, vitamina A, niacina, gluconato de cobre, vitamina D, vitamina B12, vitamina B6, tiamina, riboflavina y ácido fólico.	2

Fuente elaboración propia según información de NTC y CONPES (82)

En el siguiente gráfico se representa el porcentaje de participación de cada una de las materias primas empleadas para la elaboración de la Bienestarina (Gráfica 5-3).

Gráfica 5-3 Porcentaje de participación por ingrediente de la Bienestarina



Fuente CONPES (82)

- Premezcla de vitaminas y minerales

La Bienestarina cuenta con una premezcla de micronutrientes, la cual se ajusta a las necesidades específicas de la población colombiana, ya que para su formulación se toman como base los resultados de encuestas nacionales de situación de nutrición y salud. Los componentes de la mezcla de micronutrientes son: fosfato tricálcico, hierro aminoquelado, vitamina C, zinc aminoquelado, vitamina A, niacina, gluconato de cobre, vitamina D, vitamina B12, vitamina B6, tiamina, riboflavina y ácido fólico (83).

Hierro y zinc: La adición a la premezcla se realiza en su forma *aminoquelada*. Los minerales quelados se forman con el intercambio de electrones entre un metal y un agente quelante, conformando una estructura cíclica, por enlaces covalentes. Los agentes quelantes más comunes son los aminoácidos, pero también péptidos, polisacáridos complejos y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los minerales quelados han sido clasificados como de alta solubilidad estabilidad y disponibilidad biológica. El análisis de estudios publicados demuestra que existen diferencias en cuanto a la biodisponibilidad entre la suplementación de minerales quelados y no quelados. Esto puede estar relacionado con el proceso de absorción y transporte de los metales en el intestino (41).

A continuación, se presenta el contenido nutricional de Bienestarina para 100 gramos de producto y por porción de 15 gramos. (Tabla 5-3)

Tabla 5-3 Aporte nutricional de la Bienestarina el polvo

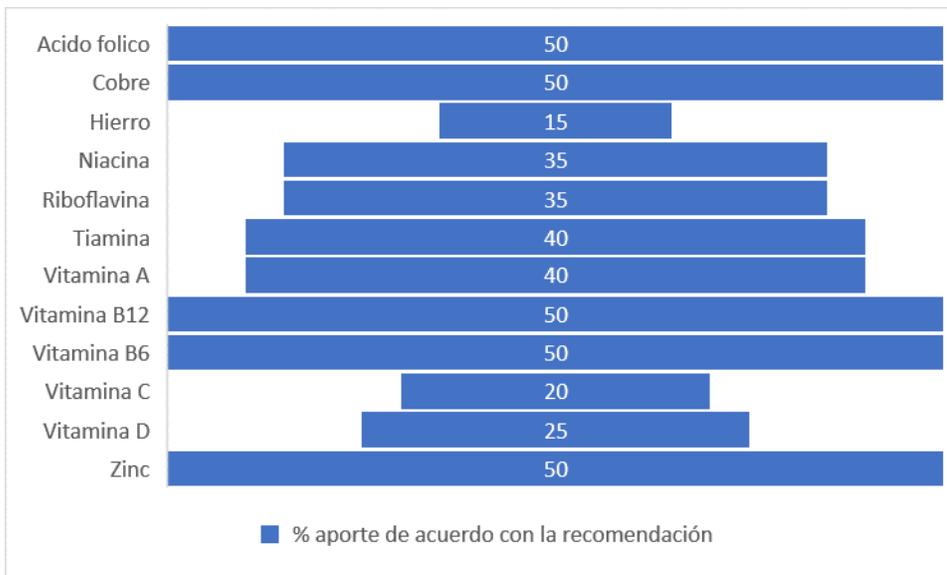
Nutrientes	Unidad	En 100 g de producto	En 15 g de producto
Calorías	Kcal	360	54
Proteínas	g	21.0	3.2
Grasa	g	3.0	0.5
Carbohidratos	g	63.0	9.5
Fibra	g	1.3	0.2
Calcio	mg	800.0	120.0
Fósforo	mg	600.0	90.0
Hierro	mg	10.5	1.6
Vitamina A	U.I.	3330.0	499.5
Vitamina C	mg	45.0	6.8
Tiamina (Vitamina B1)	mg	1234.0	185.1
Niacina	mg	12.3	1.9
Riboflavina (Vitamina B2)	mg	1.0	0.2
Vitamina B6	mg	1333.0	200.0
Ácido fólico	mcg	382.3	57.3
Vitamina B12	mcg	2.3	0.3
Zinc	mg	10.5	1.6
Vitamina D	UI	333.3	50.0
Cobre	mg	1.0	0.1
Ácidos Grasos Omega 3	mg	100.0	15.0

Fuente ICBF (83)

La Bienestarina cubre alrededor de un 50% de las recomendaciones de ácido fólico, cobre, vitaminas B₁₂, B₆ y zinc, (gráfica 5-4) y un 15% de las recomendaciones de hierro, los porcentajes de valores diarios están basados en una dieta para niños y niñas mayores de seis meses y menores de 4 años de edad, de acuerdo con la resolución 333 de 2011 (83).

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad in vitro de hierro y zinc en mezclas vegetales

Gráfica 5-4 Porcentaje de aporte por porción de Bienestarina en cada uno de los nutrientes de la premezcla



Fuente elaboración propia según rotulado nutricional del empaque.

- Compuestos que inhiben la absorción de nutrientes

Adicional a la identificación de los ingredientes que son utilizados para la elaboración de la Bienestarina, las características de la matriz y el aporte de los micronutrientes, se considera importante tener en cuenta la existencia de factores que pueden inhibir la absorción de los minerales (Tabla 5-4)

Tabla 5-4 Tabla de factores que inhiben la absorción de hierro

Factores que inhiben la absorción del hierro	Efectos en la absorción	Alimentos fuente de estos factores
Calcio	Interfiere considerablemente en los porcentajes de absorción, tanto del hierro hemínico como del no hemínico, reduciendo la tasa de biodisponibilidad entre 30 y 50%. Forman compuestos insolubles	Leche y derivados Citrato de calcio Carbonato de calcio
Fitatos	Los derivados hexa y penta fosfatos del ácido fítico presente forman complejos insolubles a un pH cercano a la neutralidad impidiendo así la dializabilidad del hierro.	Semillas de cereales Leguminosas Oleaginosas

Factores que inhiben la absorción del hierro	Efectos en la absorción	Alimentos fuente de estos factores
Polifenoles (taninos)	Debido a sus numerosos radicales hidroxilos se unen fuertemente a metales, entre ellos al Fe, propiedad que les confiere la capacidad de ser fuertes inhibidores de la absorción, disminuyéndola hasta en 60%.	Té, café, leguminosas, espinacas, cereales
Carbonatos	Existen principalmente en las leguminosas, pero debido a su carácter termolábil se logra reducir su concentración con el proceso de cocción y se disminuye la interferencia con la absorción del hierro.	Leguminosas
Oxalatos	Debido a su carácter termolábil se logra reducir su concentración con el proceso de cocción y se disminuye la interferencia con la absorción del hierro.	Vegetales de color verde Leguminosas

Fuente González (84)

- Presentación de la Bienestarina

La Bienestarina es un alimento pre-cocido, basado en una mezcla de harinas y/o féculas de cereales (trigo, maíz), harina de soya y leche entera en polvo, con vitaminas y minerales (85). Actualmente se producen en presentación de 900 gramos (Ilustración 5-1)

Ilustración 5-1 Presentación del empaque de Bienestarina



Fuente: <https://www.icbf.gov.co/bienestarina-mas-r-0>

- Formas de preparación

De acuerdo con la evaluación de impacto de la Bienestarina, las coladas, son las preparaciones más consumidas por los beneficiarios de los programas del ICBF. Este producto se usa como complemento para la alimentación a partir de 6 meses de edad. El 98.9% de los que reciben Bienestarina para preparar en el hogar, tienen un consumo usual de por lo menos una preparación al mes. Entre el 80% y 85% consumen colada de Bienestarina mínimo una vez a la semana. Además, tiene una muy buena percepción y aceptación. Las personas que la consumen consideran que contribuye al crecimiento y salud de los niños y gestantes. La colada se ofrece generalmente como bebida al desayuno o en alguno de los refrigerios (86). Por otra parte la ENSIN 2015 muestra que el 54% de los menores de 3 a 4 años, el 26% de los niños y niñas de 5 a 12 y el 23% de las gestantes consumen Bienestarina (5). Considerando tanto el consumo frecuente como la aceptabilidad del producto, se considera importante realizar la estimación de la bioaccesibilidad de hierro y zinc en la colada de Bienestarina. Esta información sería de gran ayuda para proponer ajustes en la formulación de los productos fortificados, y que puedan aportar de manera más eficiente al cubrimiento de las necesidades de los nutrientes de interés, primordialmente para la población que se encuentra en etapas de crecimiento y desarrollo rápido por tener más altas demandas.

Con el fin de lograr variedad en las preparaciones con Bienestarina, se ha elaborado un recetario, en el que se consignan preparaciones como arepas, sopas, croquetas, torrijas o arepuelas, tortas o ponqués y Bienestarina en jugos con o sin leche, preparaciones que también gozan de alta aceptabilidad (86). Las cuales podrían tenerse en cuenta para estudios posteriores.

5.3 Propuesta de estimación de la bioaccesibilidad *in vitro*

A continuación, se describe la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad de los minerales mencionados por cada una de las fases:

Materia prima: Bienestarina, colada.

Ingredientes:

- Bienestarina 15 gramos
- Azúcar 5 gramos
- Agua 180 mililitros

Preparación:

- En un recipiente mezclar el azúcar y la Bienestarina
- Agregar el agua mezclando continuamente
- Colocar a fuego alto y mezclando continuamente hasta alcanzar el punto de ebullición
- Bajar el fuego a intensidad media y dejar en ebullición durante 5 minutos sin dejar de mezclar.
- Retirar del fuego y dejar enfriar hasta 37 grados

5.3.1 Preparación preliminar

- **Tratamiento previo a la matriz**, antes de la fase oral, se somete la muestra en polvo a diferentes tratamientos para la elaboración de la colada, siguiendo las instrucciones de preparación establecidas (Tabla 5-5).

Tabla 5-5 Tratamiento preliminar de la muestra antes de la etapa oral

Tipo de Matriz	Matriz alimentaria	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3
Preparación de mezcla vegetal	Colada de Bienestarina	Pesaje y alistamiento de ingredientes	Preparación de la colada	Homogenización

- Preparación de Materiales, equipos y reactivos

Previo a la realización del ensayo se debe disponer de los siguientes materiales y equipos, como condiciones mínimas para llevar a cabo el procedimiento correspondiente:

Tabla 5-6 Materiales y equipos para estimación de bioaccesibilidad

Materiales y Equipos
Centrífuga de laboratorio estándar
Agitador vortex estándar

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad in vitro de hierro y zinc en mezclas vegetales

Materiales y Equipos
Medidor de pH de laboratorio estándar (con electrodo diseñado para alimentos)
Agitador
Incubadora ajustable a 37 ° C
Tubos Eppendorf
Tubos de centrifuga de plástico
Micropipetas y puntas
Matraces aforados para soluciones.
Vasos de precipitados de vidrio

A continuación, se relacionan los reactivos necesarios para la preparación de los fluidos simulados utilizados en el ensayo, el procedimiento de preparación se encuentra descrito en el Anexo 3.

Tabla 5-7 Materiales y equipos para estimación de bioaccesibilidad

Reactivos para preparación de Fluidos Digestivos Simulados
Volúmenes mínimos de soluciones stock necesarios para la preparación de 500 mL de cada fluido simulado
0,5 ml de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M)
30 ml de KCl (0,5 M)
6 ml de KH_2PO_4 (0,5 M)
65 ml de NaHCO_3 (1 M)
25 ml de NaCl (2 M)
2 ml de $\text{MgCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$ (0,15 M)
2 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0,5 M)
NaOH 1 M y HCl 1 M (un mínimo de ~ 5 ml): para ajustar el pH

Basado en protocolo de consenso internacional (3)

5.3.2 Fase oral

De acuerdo con los lineamientos generales a nivel internacional, es necesario tener en cuenta la importancia de la aplicación de la etapa oral en las muestras en las que se incluya la Bienestarina, debido a su contenido de carbohidratos en su composición, (Tabla 5-2) los cuales en su mayoría corresponden a almidón que proviene del endospermo molido de granos de cereal y leguminosa, por lo tanto es necesaria la exposición a la *amilasa salival*, cuya función es la de iniciar el proceso de hidrolisis, tal como sucede en la digestión *in vivo*. Por su parte en la actualización del consenso internacional se determinó la importancia de realizar la etapa oral en todos los casos, no solamente por la exposición a las enzimas, sino por la consistencia que debe mantenerse en la dilución para la aplicación de las fases posteriores (66).

La fase oral implica el precalentamiento de la muestra a 37 grados Celsius (para facilitar el control de la duración de la fase y poder garantizar la repetitividad del ensayo) simulando la temperatura de la cavidad oral, la dilución de 5ml de la muestra 1: 1 (peso / peso) con líquido salival simulado (SSF), 0.5 ml de amilasa salival, seguido de la adición de CaCl₂ y el agua para completar la dilución requerida, durante un tiempo de 2 min a pH 7 (tabla 5-8) (66). El fluido salival simulado FSS es utilizado para imitar la saliva, la cual contiene gran variedad de electrolitos principalmente sodio, potasio, fosfatos, magnesio calcio y bicarbonato. Tanto los bicarbonatos como los fosfatos y la urea ayudan a regular el pH y la capacidad amortiguadora de la saliva (27).

Tabla 5-8 Procedimiento Digestión Oral Simulada para Bienestarina

Alimento	Colada de Bienestarina	Cantidad	Característica
		5 ml	Se utilizan 15 gramos de producto por porción
Medio Utilizado	FSS	4 ml	Preparación estándar de electrolitos
Enzima	alfa amilasa	0.5 ml	alfa-amilasa humana tipo IX-A, 1000-3000 U /mg proteína
Sales	CaCl ₂	25 µL	0,3 M
Otras sustancias	Agua	475 µL	
Tiempo de exposición	2 minutos		

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad in vitro de hierro y zinc en mezclas vegetales

Alimento	Colada de Bienestarina	Cantidad	Característica
		5 ml	Se utilizan 15 gramos de producto por porción
pH		7	
Temperatura		37 °C	
Recomendaciones	Precalentamiento de todos los reactivos a 37 °C debido a la duración corta de la fase. Mezclar bien		
Producto	Bolo oral de Bienestarina		

Cálculos basados en la metodología INFOGEST(87)

^a Concentraciones finales.

5.3.3 Fase gástrica

La duración de esta etapa para un alimento líquido se caracteriza por un vaciado de inicio rápido (3), con un pH relativamente bajo desde el comienzo de la digestión, si no se cuenta con el efecto buffer inicial del alimento (la capacidad amortiguadora se refiere a la resistencia de una solución a cambiar el pH con la adición de un ácido o una base), lo cual es importante en la digestión gástrica. La velocidad a la que los alimentos se descomponen durante la digestión gástrica está influenciada por varios factores, como las propiedades iniciales de los alimentos, el tamaño de la comida, la cantidad de secreciones gástricas y pH intragástrico (88).

Para la etapa gástrica se establece de igual manera, el uso de una solución electrolítica especial, con pequeñas variaciones respecto a la fase oral, con el fin de brindar un medio propicio para que actúen las enzimas, simulando la acción del jugo gástrico en una digestión real. Por lo tanto se plantea agregar la solución madre de electrolitos SGF al bolo oral para lograr una proporción final de 1: 1 (vol / vol) con líquido gástrico simulado y enzimas gástricas (pepsina y lipasa) y se incuba con agitación a pH 3,0 (aportado principalmente por el HCl) durante 2h (66) (tabla 5-9).

Tabla 5-9 Procedimiento Digestión Gástrica Simulada para colada de Bienestarina

Alimento	Bolo oral de Bienestarina	Cantidad	Característica
		10 ml	Proveniente de la fase oral
Medio Utilizado	SGF	8 ml	Preparación estándar de electrolitos
Sales	CaCl ₂	5 µL	0,3 M
Acido/base	HCl	0,1 mL	Para ajuste a pH 3 De acuerdo con ensayo previo
Extracto gástrico de conejo	Lipasa gástrica	0.5 mL	60 U/mL ^a
Enzima	pepsina porcina	0.5 mL	2000 U/mL ^a
Otras sustancias	Agua	0,895 µL	
Tiempo de exposición	2 horas		
pH	3		
Temperatura	37 °C		
Recomendaciones	Agregar, la cantidad de agua necesaria a la mezcla, para diluir la solución stock de SGF Mezcla constante		
Producto	Quimo gástrico de Bienestarina		

Cálculos basados en la metodología INFOGEST(87)

^a Concentraciones finales.

En esta fase se inicia de manera incipiente el proceso de hidrólisis tanto de proteínas (pepsina porcina) como de lípidos (lipasa gástrica), la cual se continuará y finalizará en fase intestinal.

5.3.4 Fase intestinal

Posterior a la fase gástrica, ocurre la simulación de la digestión del intestino delgado. Para iniciar esta fase se da un vaciamiento de forma gradual, desde el estómago hasta el intestino, donde el material entra en contacto con sustancias como jugo pancreático y bilis entre otros. Es así como el quimo gástrico de la muestra, producto de la fase oral, se mezcla con enzimas (tripsina, quimiotripsina, lipasa, colipasa y alfa amilasa) y con sales biliares (en cuya composición hay compuestos orgánicos e inorgánicos). Con una variación importante en el pH, asociado a la presencia de lipasas, amilasas y proteasas pancreáticas principalmente (66).

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad in vitro de hierro y zinc en mezclas vegetales

Para esta fase, se plantea el uso de fluido intestinal simulado (SIF), el cual difiere del gástrico por la concentración de algunas sales. Este medio brinda el escenario adecuado para la actividad enzimática. Se continúa con la condición de simulación de la temperatura corporal con el precalentamiento de la solución madre de electrolitos SIF en un baño de agua a 37 ° C y adición al quimo gástrico para lograr una relación final de 1: 1 (vol / vol). (Tabla 5-10).

Tabla 5-10 Procedimiento digestión intestinal simulada para colada de Bienestarina

Alimento	Quimo gástrico de Bienestarina	Cantidad	Característica
		20 ml	Proveniente de la fase gástrica
Medio Utilizado	SIF	8.5 ml	Preparación estándar de electrolitos
Enzima	Tripsina porcina	1 mL	100 U/mL ^a
Enzima	Quimotripsina bovina	1 mL	25 U/mL ^a
Enzima	Lipasa porcina pancreática	1 mL	2000 U/mL ^a
Enzima	Colipasa	1 mL	6000 U/mL ^a
Enzima	Alfa amilasa intestinal	1 mL	200 U/mL ^a
Sales biliares	Porcina	2.5 mL	10 mM ^a
Sales	CaCl ₂	40 µL	
Para ajuste de pH	Acido/base	0.2 mL	De acuerdo con ensayo previo
Otras sustancias	Agua	3.76 mL	Ajuste a la concentración final
Tiempo de exposición	2 horas		
pH		7	
Temperatura		37 °C	
Recomendaciones	Verificar el pH y determinar la cantidad de NaOH / HCl requerido hacer un experimento de prueba antes del ensayo.		
Producto	Digerido de Bienestarina		

Cálculos basados en la metodología INFOGEST(87)

^a Concentraciones finales.

Después del vaciamiento gástrico, el quimo es neutralizado por la secreción de carbonato, por lo que se encuentra alrededor de pH 6,5 dependiendo tanto de la comida, como de la tasa de vaciamiento. El pH luego se debe aumentar a un valor cercano a 7,5 en el íleon distal. Por lo tanto, en el modelo *in vitro*, se utiliza un valor medio de 7,0 utilizando la adición de SIF e hidróxido de sodio (3).

En los trabajos de investigación que fueron analizados, la fase intestinal se rige por la actividad de pancreatina, sin embargo, se sugiere preferiblemente la utilización de enzimas individuales, debido a que se facilita el control y ajuste de cada una de ellas, de acuerdo con la composición de la matriz alimentaria. La concentración de estas enzimas proteolíticas: tripsina (100 U/mL), quimotripsina (25U/mL); lipolítica: lipasa (2000U/mL), colipasa (6000U/mL) y amilolítica: alfa amilasa (200U/mL) se adicionan en un volumen igual de 1 mL. (la actividad enzimática se expresa de acuerdo con el consenso internacional). El HCl y el agua se deberán monitorear de tal manera que su adición permita el ajuste del pH.

Como parte de la fase intestinal, se propone la realización de diálisis como una alternativa muy adecuada para determinar la bioaccesibilidad de los minerales. Considerando que el nutriente que logre pasar a través de la membrana tendrá una alta probabilidad de ser aprovechado por el cuerpo humano (69).

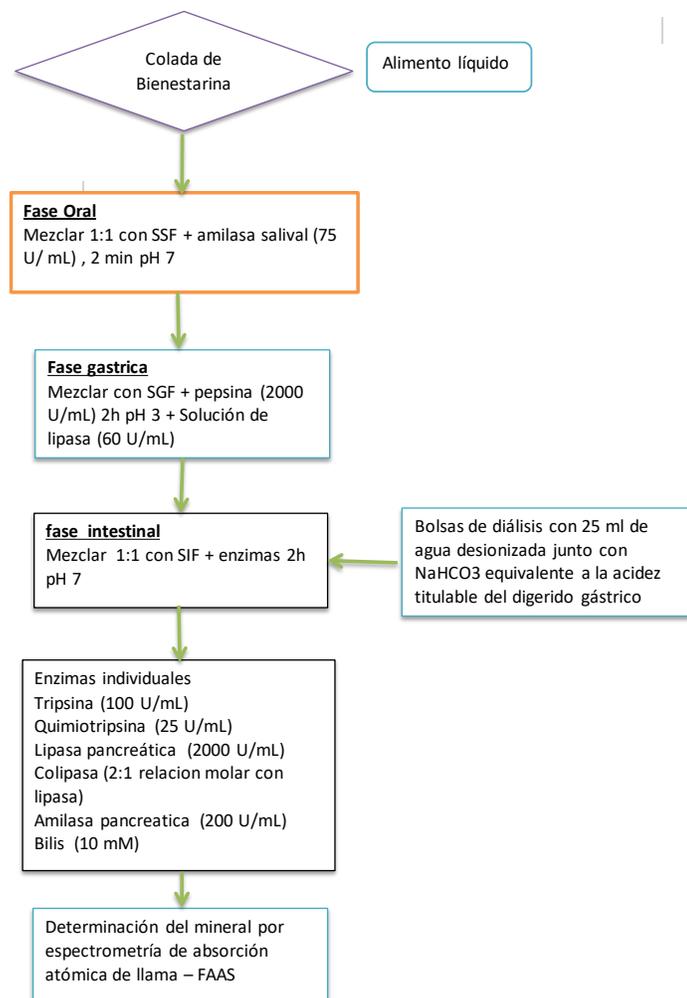
En esta propuesta *in vitro*, se plantea el empleo de bolsas de diálisis bolsa de diálisis, con corte de peso molecular de 12.000 a 16.000 y porosidad de 25 Å, de acuerdo con lo utilizado por Rebellato (56), las cuales deben contener 25 ml de agua desionizada junto con NaHCO₃ equivalente a la acidez titulable del digerido gástrico (previamente determinada hasta pH 7.5 con NaOH). Las bolsas se colocan junto con el digerido gástrico y la solución de enzimas y sales biliares; se propone una incubación por 2 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente proceder a inhibir la acción enzimática para detener el proceso hidrolítico.

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad *in vitro* de hierro y zinc en mezclas vegetales

La determinación cuantitativa de los minerales en el dializado obtenido, en lo posible, debe ser iniciada de manera inmediata; de lo contrario, es importante almacenar los dializados a bajas temperaturas.

A continuación, el diagrama del proceso que se aplicaría para la realización de la digestión *in vitro* para Bienestarina

Ilustración 5-2 Diagrama del proceso para la digestión *in vitro* de Bienestarina



5.3.5 Medición del contenido de hierro y zinc

Posterior al proceso de digestión *in vitro* se realiza la medición del contenido de hierro y zinc en el producto digerido, para lo cual se contemplan diferentes metodologías, tales como espectrometría de absorción atómica y espectrometría de emisión atómica.

Espectrometría de absorción atómica: desde su invención, este ha ganado aceptación como método estándar para el análisis de elementos metálicos y no metálicos. El método es ampliamente aceptado, ya que la técnica es selectiva por elementos y proporciona sensibilidades analíticas al nivel de partes por millón y menos. La cuantificación en AAS se logra midiendo la cantidad de especies absorbentes producidas en una longitud de onda analítica dada (74). Consiste en la vaporización de la muestra a altas temperaturas, descomponiéndola en los átomos del elemento de interés. Una lámpara de longitud de onda especial excita los átomos del metal y la energía absorbida por estos es proporcional a la concentración del analito en la muestra. En este tipo de espectrometría existen dos tipos de atomización de muestra. La primera es por llama (FAAS), que llega a una temperatura de 2000 – 3000 °K y horno de grafito que llega a una temperatura máxima de 2825 °K, en esta última la atomización es más eficiente, y aumenta la sensibilidad (89).

La espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS) es un método analítico maduro, que está presente en varios laboratorios analíticos como elemento de trabajo común para las determinaciones de metales. Se sigue innovando con respecto a la introducción de la muestra en el atomizador y los tiempos de residencia en el mismo (90).

En la espectrometría de emisión atómica la atomización de la muestra se realiza por medio de plasma acoplado por inducción, el cual alcanza una temperatura de 6000 a 10.000 °K, allí se cuantifica la concentración del analito por medio de la energía que emiten los átomos del elemento de interés (89). Este método está basado en un plasma eléctricamente neutro y altamente energético, compuesto por iones, electrones y partículas neutras, generalmente de argón, y recibe la energía de un campo electromagnético de alta frecuencia o de una corriente continua (73).

La ventaja de este último método es que se pueden cuantificar varios elementos en simultáneo, mientras que en la absorción atómica solo se puede cuantificar un elemento debido a las interferencias espectrales de otros átomos (89). Sin embargo, para su aplicación se hace necesario la utilización de equipos e insumos de más alto costo, lo que

podría limitar el número de análisis a realizar, así como la réplica de este en posteriores estudios que permitan, por ejemplo, comparar resultados.

Dado que estos métodos tienen una gran sensibilidad, capacidad para distinguir un elemento de otro en muestras complejas y de realizar análisis multi elemental simultaneo (en el caso de espectrometría de emisión atómica), así como la facilidad con la que se puede analizar automáticamente muchas muestras, la espectroscopia atómica es una técnica de gran importancia y sensibilidad en química analítica, por esta razón sería el método sugerido (89).

5.3.6 Estimación del porcentaje de bioaccesibilidad

La estimación del porcentaje de bioaccesibilidad de los minerales mencionados, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Bioaccesibilidad} = (\text{cantidad del mineral dializado} / \text{cantidad del mineral en la muestra}) \times 100$$

Con la aplicación del proceso se estimará el porcentaje de bioaccesibilidad de los nutrientes de interés (52). La información generada en el proceso será útil para tener una aproximación más real de la cantidad del nutriente efectivamente disponible en el organismo para ser absorbido. De esta manera sería posible plantear ajustes a la formulación del producto.

5.3.7 Variación de digestión intestinal propuesta para colada de Bienestarina

De acuerdo con lo revisado previamente y considerando las características de la matriz alimentaria se propone la posibilidad de incluir una modificación en el procedimiento de la fase intestinal, de la siguiente manera: la Bienestarina tiene una cantidad de grasa que corresponde a 0.5 g por porción, lo que se considera una cantidad baja, por lo que no sería necesaria una concentración alta de lipasa intestinal para lograr una digestión completa del producto. Al respecto con relación a los estudios revisados, De-Regil, trabajó con atole de harina de maíz, preparación similar a la colada de Bienestarina, utilizando una concentración de 16 U/ml de lipasa pancreática, para la fase intestinal, por lo tanto, se propone utilizar la misma concentración de la enzima, haciendo también el ajuste de

colipasa, conservando la proporción indicada de relación molar de 2:1 (colipasa a lipasa) el ajuste propuesto se observa a continuación (tabla 5-11)

Tabla 5-11 Variación propuesta de digestión intestinal simulada para colada de Bienestarina

Alimento	Quimo gástrico de Bienestarina	Cantidad	Característica
		20 ml	Proveniente de la fase gástrica
Medio Utilizado	SIF	8.5 ml	Preparación estándar de electrolitos
Enzima	Tripsina porcina	1 mL	100 U/mL ^a
Enzima	Quimotripsina bovina	1 mL	25 U/mL ^a
Enzima	Lipasa porcina pancreática	1 mL	16 U/mL ^a
Enzima	Colipasa	1 mL	48 U/mL ^a
Enzima	Alfa amilasa intestinal	1 mL	200 U/mL ^a
Sales biliares	Porcina	2.5 mL	10 mM ^a
Sales	CaCl ₂	40 µL	
Para ajuste de pH	Acido/base	0.2 mL	De acuerdo con ensayo previo
Otras sustancias	Agua	3.76 mL	Ajuste a la concentración final
Tiempo de exposición	2 horas		
pH		7	
Temperatura		37 °C	
Recomendaciones	Verificar el pH y determinar la cantidad de NaOH / HCl requerido hacer un experimento de prueba antes del ensayo.		
Producto	Digerido de Bienestarina		

Cálculos basados en la metodología INFOGEST(87)

^a Concentraciones finales.

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad in vitro de hierro y zinc en mezclas vegetales

La propuesta de estimación de bioaccesibilidad aquí presentada, es general para la colada de Bienestarina, como preparación base y puede considerarse una primera aproximación a la medición de la accesibilidad de minerales en la misma. Se busca que a medida que se vaya avanzando en la aplicación de la metodología se realicen los ajustes a los que haya lugar, teniendo en cuenta que la Bienestarina, como alimento complementario fortificado, tiene una composición a base de mezclas de alimentos pulverizados de origen vegetal, leche en polvo y mezcla de micronutrientes que puede variar de acuerdo con las necesidades nutricionales específicas de cada grupo (81). Estas características permiten Inferir que se trata de una matriz compleja, y que deben ser consideradas las potenciales interacciones que pueden generarse y que influyen en el aprovechamiento de los nutrientes.

Según la literatura consultada y como se había mencionado previamente, se presentan dentro de las mezclas vegetales compuestos que interfieren en la bioaccesibilidad de minerales, por lo tanto es necesario considerar el efecto sobre esta de los pretratamientos a las materias primas como la precocción de las harinas, debido a que muchas de las sustancias que interfieren en la absorción son termolábiles (84). Adicionalmente, los efectos de la inclusión de procesos preliminares como molienda, remojo, germinación y fermentación en cereales y leguminosas como materia prima (41). Otra alternativa importante es la modificación de la sal utilizada para fortificación, con el fin de evaluar tanto su efecto de acuerdo con su naturaleza, como su concentración para obtener información más confiable que permita un ajuste adecuado de la formulación. También es posible evaluar la adición de sustancias que promuevan la absorción de los minerales como el ácido ascórbico (41). La medición de la bioaccesibilidad es vital para medir la efectividad de cada uno de estos procesos, los cuales van encaminados a mejorar la absorción de nutrientes.

Lo anterior confirma de manera concluyente que la estimación de la bioaccesibilidad puede ser una herramienta muy útil para verificar la capacidad del alimento para proveer nutrientes con el efecto esperado en la población que se quiere atender, en este caso población vulnerable, con deficiencias de micronutrientes.

Es necesario entonces buscar el mayor impacto en las intervenciones que se realicen para disminuir la deficiencia de micronutrientes, considerando las consecuencias que tiene la malnutrición, como debilitar el capital humano, con consecuencias irreversibles e intergeneracionales en el desarrollo cognitivo y físico, afectando el rendimiento escolar y el futuro ámbito laboral. La malnutrición está relacionada de manera directa o indirecta con gran parte de las defunciones infantiles, además de ser el factor con más peso en la carga de morbilidad en países en desarrollo (91). La malnutrición afecta el crecimiento económico y perpetúa la pobreza, trayendo pérdidas directas de productividad por el mal estado de salud, pérdidas indirectas relacionadas con el deterioro de las funciones cognitivas y la falta de escolaridad y pérdidas por aumento de los costos de atención en salud (4).

5.3.8 Análisis estadístico de los datos

Para la propuesta de estimación de la bioaccesibilidad *in vitro* se plantea la realización de los análisis por triplicado tanto al alimento inicial, como al producto final de la aplicación de la digestión *in vitro*, para determinar la cantidad de hierro y zinc bioaccesible.

Después de realizar un estudio inicial del método se debería realizar una validación de este, donde se demuestre por medio de varias herramientas estadísticas que el método funciona para la matriz de estudio y de este modo estandarizarlo para hacer seguimiento a las cantidades bioaccesibles de micronutrientes dentro del alimento. La validación es el proceso para definir un requisito analítico, así como la verificación de que este cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones que se requieren. Unido a esto, está la necesidad de evaluar el desempeño del método (92).

Para efectos de validar este método se hace necesario estudiar parámetros como precisión (repetibilidad y reproducibilidad), límite de detección, límite de cuantificación y linealidad.

Precisión: se define como la medida de que tan cerca están los resultados entre sí. Por lo general, la precisión de la medición se expresa numéricamente con medidas de imprecisión, como varianza, desviación estándar o coeficiente de variación, en condiciones de medición específicas (92) (93).

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad in vitro de hierro y zinc en mezclas vegetales

Repetibilidad: es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se realiza por un solo analista, con el mismo equipo en un plazo corto de tiempo. Supone la más pequeña variación en los resultados. La repetibilidad se refiere también como precisión “dentro de un lote”, “dentro de la serie de medida” o “intra-ensayo” (92).

Reproducibilidad, es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios, la variación entre laboratorios empleando el mismo método. También puede referirse a la variación observada entre laboratorios empleando métodos diferentes, pero con la intención de medir la misma magnitud. Supone dar la mayor variación en los resultados (92). Incluye diferentes ubicaciones, operadores, sistemas de medición y replicar mediciones en el mismo objeto o en objetos similares (93).

Límite de detección: se define a partir de la aplicación del método y representa la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza determinado. Existen dos tipos de límite de detección: uno propio del instrumento y otro propio del método. El límite de detección del instrumento proviene del blanco de reactivo sometido al instrumento omitiendo cualquier paso de preparación de la muestra. El límite de detección del método proviene del análisis de blancos que hayan sido sometidos a todo el proceso de medición (92).

Límite de cuantificación: este representa el nivel de concentración de analito más bajo aceptable para una aplicación típica. El LOQ se puede calcular a partir de la desviación estándar obtenida, dependiendo del número de réplicas o efecto del blanco, multiplicándolo por un factor K_Q (que generalmente es 10). El límite de cuantificación se calcula multiplicando la desviación estándar de los blancos por un factor de 10 (92).

Linealidad: se puede evaluar utilizando la curva de calibración. Para esto se sugiere que se tengan de 6 a 10 concentraciones de estándares diferentes, distribuidas de manera uniforme en el rango de interés, incluyendo el blanco. Al graficar las concentraciones contra la respuesta generada por el equipo, se observa la tendencia que estos cumplen, sin embargo, es necesario un análisis matemático que permita llegar a la línea promedio (92).

En la tabla 5-12 se pueden observar los procedimientos de análisis propuestos para la verificación de cada una de las características de desempeño.

Tabla 5-12 Procedimientos de análisis para cada característica de desempeño

Característica de desempeño	Procedimiento	Tratamiento estadístico
Linealidad	Seis soluciones por triplicado de Bienestarina enriquecida con concentraciones conocidas de hierro. Seis soluciones por triplicado de Bienestarina enriquecida con concentraciones conocidas de zinc.	Regresión lineal
Límite de detección (LOD)	Diez blancos de procedimiento para hierro.	Promedio y desviación estándar
Límite de cuantificación (LOQ)	Diez blancos de procedimiento para zinc.	
Repetibilidad	Diez réplicas por un mismo analista en un periodo corto de tiempo para hierro. Diez réplicas por un mismo analista en un periodo corto de tiempo para zinc.	Promedio, desviación estándar y T de Student
Reproducibilidad	Tres réplicas por cada uno de los analistas en dos días diferentes (12 en total) para hierro Tres réplicas por cada uno de los analistas en dos días diferentes (12 en total) para zinc	ANOVA

Adaptado de Eurolab España, 2016 (92)

Los procedimientos de análisis para las características de desempeño mencionados en el cuadro anterior están basados en los parámetros de Eurachem, red de organizaciones europeas, que establece un sistema para la trazabilidad internacional de mediciones químicas y promueve buenas prácticas de calidad. De acuerdo con lo planteado, es importante resaltar la complejidad y los costos del proceso, sin embargo, se hace necesaria su realización como parte fundamental de la investigación sobre el tema de medición de bioaccesibilidad de hierro y zinc en mezclas vegetales, especialmente la Bienestarina,

Planteamiento de la propuesta para la estimación de bioaccesibilidad in vitro
de hierro y zinc en mezclas vegetales

teniendo en cuenta el impacto que se quiere lograr a nivel poblacional en Colombia, dando prioridad a los grupos más vulnerables, afectados por la carencia de micronutrientes.

6 Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La revisión bibliográfica permitió compilar y sintetizar la información sobre las diferentes metodologías empleadas en la medición *in vitro* de la bioaccesibilidad de hierro y zinc en diferentes matrices alimentarias fortificadas, evaluar las metodologías empleadas y de esta manera realizar una síntesis de la evidencia disponible sobre el tema.

En las metodologías analizadas se observó una gran variabilidad en aspectos como el número de etapas digestivas aplicadas, la concentración de enzimas, la adición de sales y la utilización de fluidos simulados. Esta variabilidad dificulta la comparación de los resultados de bioaccesibilidad obtenidos para las diferentes matrices alimentarias, por lo que es necesario recurrir a metodologías estandarizadas, que permitan establecer condiciones similares para la realización de los ensayos y de esta manera lograr que sean comparables.

La propuesta de estimación de bioaccesibilidad se realizó a partir de una cuidadosa revisión y análisis de los métodos utilizados en las diferentes matrices alimentarias de los estudios consultados. Igualmente se tuvo en cuenta el consenso internacional propuesto para la determinación de bioaccesibilidad *in vitro*.

La propuesta se planteó para la colada de Bienestarina, lo que a futuro facilitará el diseño de nuevas metodologías para otras matrices alimentarias fortificadas, considerando que la estimación de la bioaccesibilidad es una herramienta muy importante especialmente para el diseño y reformulación de estos productos.

6.2 Recomendaciones

Se sugiere realizar el proceso de la estimación de la bioaccesibilidad de acuerdo con la metodología planteada, considerando que con los resultados obtenidos en las primeras mediciones se obtendrá información que permitirá realizar los ajustes de acuerdo con las características de la matriz, y de esta manera validar el modelo.

Se recomienda, a partir de la metodología establecida, realizar estudios de bioaccesibilidad que sirvan como base para el planteamiento de la reformulación de la mezcla vegetal, orientados a evaluar el efecto de las sales empleadas en la mezcla de micronutrientes; a proponer tratamientos adicionales a las materias primas con el fin de mejorar la calidad nutricional del producto, como las primeras aplicaciones del método, permitiendo llevar a cabo el objetivo de suministrar nutrientes que efectivamente contribuyan al logro de lo establecido para la mezcla vegetal.

Se sugiere que en una nueva etapa del avance de la aplicación de bioaccesibilidad se incluyan otras preparaciones con Bienestarina que gozan de gran aceptabilidad por parte de los beneficiarios como arepas, sopas, croquetas o arepuelas, tortas o ponqués y Bienestarina en jugos con o sin leche, para esto se hace necesario tener en cuenta las características de cada preparación a fin de lograr adecuarla para el desarrollo de la digestión *in vitro*.

Teniendo en cuenta que la bioaccesibilidad es un paso previo a la medición de la biodisponibilidad, se recomienda que a futuro puedan crearse protocolos para evaluar la biodisponibilidad *in vitro* de los micronutrientes dentro de la mezcla vegetal, incluyendo además de la solubilidad potencial de los minerales, la capacidad que tienen de ser absorbidos y metabolizados por el organismo.

A. Anexo 1. Estrategia de búsqueda

Fecha: 24/03/2020		
Base de datos: Pubmed		
ESTRATEGIA		Resultados
1	"fortified complementary foods" OR "fortified foods" OR "Food, Fortified" OR "infant foods" OR "vegetable mixes"	9,921
2	Bioaccessibility OR "simulated digestion" OR "mineral bioaccessibility" OR "In vitro digestion"	3,928
3	Iron OR "Iron, dietary" OR "dietary,iron" OR zinc OR "iron absorption" OR "zinc absorption" OR "iron bioaccessibility " OR "zinc bioaccessibility " OR "iron fortification" OR "zinc fortification"	351,464
4	1 AND 2	89
5	1 AND 3	1,962
6	2 AND 3	423
7	3 AND 4	31

C. Anexo 3. Preparación de soluciones stock de fluidos de digestión simulados

Preparación de soluciones stock de fluidos de digestión simulados

Constituyente	Conc. Solución stock		SSF		SGF		SIF	
			pH 7		pH 3		pH 7	
			Vol. Stock	Conc. en SSF	Vol. Stock	Conc. En SGF	Vol. Stock	Conc. En SIF
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹
KCl	37,3	0,5	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO ₃	84	1	6,8	13,6	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	2	-	-	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,15	0,4	0,1	1,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,06	0,5	0,5	-	-

Para ajuste de pH

	mol L ⁻¹	mL	mol L ⁻¹	mL	mol L ⁻¹	mL	mol L ⁻¹
Na OH	1	-	-	-	-	-	-
HCl	6	0,09	1,1	1,3	15,6	0,7	8,4

CaCl₂(H₂O)₂ no se agrega a los fluidos de digestión simulados

	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	mmol L ⁻¹	mmol L ⁻¹	mmol L ⁻¹
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44,1	0,3	1.5 (0.75*)	0.15 (0.075*)	0.6 (0.3*)

* Entre paréntesis está la concentración de Ca²⁺ correspondiente en la mezcla de digestión final.

7 Bibliografía

1. Fernández-García E, Carvajal-Lérida I, Pérez-Gálvez A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. Nutrition Research. noviembre de 2009;29(11):751–60.
2. Cardoso C, Afonso C, Lourenço H, Costa S, Nunes ML. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. Trends in Food Science & Technology. 2015;41(1):5–23.
3. Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. Food Funct. mayo de 2014;5(6):1113–24.
4. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. The Lancet. enero de 2008;371(9608):243–60.
5. ICBF- Ministerio de Salud. Ensin - 2015 [Internet]. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional ENSIN 2015. Disponible en: <http://www.ensin.gov.co/>
6. UNICEF. Regional Office for Latin American and the Caribbean. Uso de Alimentos Complementarios Fortificados - Documents. Docslide.com.br. 2006.
7. Alminger M, Aura A-M, Bohn T, Dufour C, El SN, Gomes A, et al. In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2014;13(4):413–36.
8. Parada J, Aguilera J m. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. Journal of Food Science. 2007;72(2):R21–32.
9. Thakur N, Raigond P, Singh Y, Mishra T, Singh B, Lal MK, et al. Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. Trends in Food Science & Technology. el 1 de marzo de 2020;97:366–80.
10. Dima C, Assadpour E, Dima S, Jafari SM. Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by *in vitro* methods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. noviembre de 2020;19(6):2862–84.
11. Andrés A. La bioaccesibilidad como parámetro de optimización de procesos alimentarios y desarrollo de nuevos productos. 2015 abr 16; Puerto Madryn, Argentina.

12. Estelrich MED. Revalorización de subproductos vegetales. Efecto del procesado sobre la extracción, estabilidad y bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes. Universitat de les Illes Balears; 2019.
13. Jaiswal A, Pathania V, Lakshmi A J. An exploratory trial of food formulations with enhanced bioaccessibility of iron and zinc aided by spices. *LWT*. mayo de 2021;143:111122.
14. Lucas González R. Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión *in vitro*. *DOCTUMH*. el 25 de septiembre de 2017;2(2):5.
15. Alegría A, Garcia-Llatas G, Cilla A. Static Digestion Models: General Introduction. En: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editores. *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing; 2015. p. 3–12.
16. Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Campen DV. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr*. el 10 de enero de 1981;34(10):2248–56.
17. Haro-Vicente JF, Martínez-Graciá C, Ros G. Optimisation of *in vitro* measurement of available iron from different fortificants in citric fruit juices. *Food Chemistry*. 2006;98(4):639–48.
18. Cagnasso CE, López LB, Binaghi MJ, Pellegrino NR, Valencia ME. DIALIZABILIDAD DE HIERRO Y ZINC EN CEREALES PARA DESAYUNOS COMERCIALES FORTIFICADOS CON HIERRO ELEMENTAL, SULFATO FERROSO O EDTA FERRICO SODICO. *Revista chilena de nutrición*. junio de 2010;37(2):138–44.
19. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr*. el 1 de mayo de 2010;91(5):1461S-1467S.
20. Theil EC. Iron Homeostasis and Nutritional Iron Deficiency. *J Nutr*. el 4 de enero de 2011;141(4):724S-728S.
21. Roa I, Meruane M. Desarrollo del Aparato Digestivo. *International Journal of Morphology*. diciembre de 2012;30(4):1285–94.
22. Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL. *Krause Dietoterapia*. Elsevier España; 2012. 1263 p.
23. Murray R, Rodwell V, Bender D, Botham KM, Weil PA, Kennelly PJ. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 28th Edition. McGraw-hill; 2009. 708 p.
24. Cuesta MA, Weijs TJ, Bleys RLAW, Hillegersberg R van, Henegouwen MI van B, Gisbertz SS, et al. A new concept of the anatomy of the thoracic oesophagus: the meso-oesophagus. *Observational study during thoracoscopic esophagectomy*. *Surg Endosc*. el 6 de diciembre de 2014;29(9):2576–82.

25. Pérez-Portabella C. Fisiopatología aplicada a la nutrición. Ediciones Mayo, S.A.; 2002. 404 p.
26. Triana BEG, Soto OD, Lavandero AM, Bernabeu AS. Salivary proteins: structure, function and mechanisms of action. 2012;8.
27. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. febrero de 2001;85(2):162–9.
28. Scarano E, Fiorita A, Picciotti P, Passali G, Calò L, Cabras T, et al. Proteomics of saliva: personal experience. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. junio de 2010;30(3):125–30.
29. Engelen L, Fontijn-Tekamp A, Bilt A van der. The influence of product and oral characteristics on swallowing. *Archives of Oral Biology*. agosto de 2005;50(8):739–46.
30. Gelberg HB. Comparative Anatomy, Physiology, and Mechanisms of Disease Production of the Esophagus, Stomach, and Small Intestine. *Toxicol Pathol*. el 1 de enero de 2014;42(1):54–66.
31. Laguna RT, Claudio VS. Diccionario de nutrición y dietoterapia. México D.F.: McGraw-Hill; 2007.
32. Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Pharm Res*. enero de 2006;23(1):165–76.
33. Armand M. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand?: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. marzo de 2007;10(2):156–64.
34. Keller J, Layer P. Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*. el 7 de enero de 2005;54(suppl 6):1–28.
35. Macfarlane G t., Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*. el 1 de febrero de 2008;104(2):305–44.
36. Boticario C. Digestión y metabolismo energético de los nutrientes. UNED Plasencia; 2012. 385 p.
37. Scrimshaw NS. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. *Food & Nutrition Bulletin*. marzo de 2006;27(1):82.
38. Tostado-Madrid T, Benítez-Ruiz I, Pinzón-Navarro A, Bautista-Silva M. Actualidades de las características del hierro y su uso en pediatría. *Acta Pediátrica de México*. el 20 de mayo de 2015;36(3):189–200.

39. Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A. Homeostasis del hierro.: Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. septiembre de 2005;39(3):301–14.
40. Hernandez AG (DRT). *Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Ed. Médica Panamericana; 2010. 996 p.
41. OMS-FAO. *Guías para la fortificación de alimentos con micronutrientes*. Allen L, De Benoist B, editores. 2017.
42. Rebozo Pérez J. ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO EN NIÑOS DE 6 A 24 MESES Y DE 6 A 12 AÑOS DE EDAD. *Rev Cubana Salud Pública*. 2005;4:7.
43. Donato H. Deficiencia de hierro y anemia ferropénica. Guía para su prevención, diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediat*. el 1 de agosto de 2017;115(04).
44. Mataix J. *Tratado de Nutricion y Alimentacion*. Barcelona: Oceano; 2009.
45. Kiskini A, Kapsokefalou M, Yanniotis S, Mandala I. Effect of different iron compounds on wheat and gluten-free breads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(7):1136–45.
46. International Zinc Nutrition Consultative Group Iz. *Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in Populations and Options for its Control*. United Nations University Press; 2004.
47. King JC, Brown KH, Gibson RS, Krebs NF, Lowe NM, Siekmann JH, et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)—Zinc Review. *The Journal of Nutrition*. el 1 de abril de 2015;146(4):858S-885S.
48. Gonzalez HF. Micronutrients and neurodevelopment: An update. *Arch Argent Pediat*. el 1 de diciembre de 2016;114(6).
49. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2013;15.
50. Boccio J, Monteiro JB. Fortificación de alimentos con hierro y zinc: pros y contras desde un punto de vista alimenticio y nutricional. *Rev Nutr*. marzo de 2004;17(1):71–8.
51. Organización Mundial de la Salud O. *Recomendaciones sobre la fortificación de las harinas de trigo y de maíz Informe de reunión: Declaración de consenso provisional*. 2009.
52. Galán MG, González RJ, Drago SR. Perfil nutricional y dializabilidad de minerales de alimentos de interés social. *Rev Esp Nutr Hum Diet*. el 25 de marzo de 2013;17(1):3.
53. Schlemmer U, Frølich W, Prieto RM, Grases F. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol Nutr Food Res*. septiembre de 2009;53(S2):S330–75.

54. Wahengbam ED, Das AJ, Green BD, Shooter J, Hazarika MK. Effect of iron and folic acid fortification on in vitro bioavailability and starch hydrolysis in ready-to-eat parboiled rice. *Food Chemistry*. el 15 de septiembre de 2019;292:39–46.
55. Bryszewska MA. Comparison Study of Iron Bioaccessibility from Dietary Supplements and Microencapsulated Preparations. *Nutrients*. el 26 de enero de 2019;11(2).
56. Rebellato AP, Bussi J, Silva JGS, Greiner R, Steel CJ, Pallone JAL. Effect of different iron compounds on rheological and technological parameters as well as bioaccessibility of minerals in whole wheat bread. *Food Research International*. el 1 de abril de 2017;94:65–71.
57. Icard-Vernière C, Picq C, Courbis L, Mouquet-Rivier C. The type of fortificant and the leaf matrix both influence iron and zinc bioaccessibility in iron-fortified green leafy vegetable sauces from Burkina Faso. *Food Funct*. 2016;7(2):1103–10.
58. Kruger J, Mongwaketse T, Faber M, van der Hoeven M, Smuts CM. Potential contribution of African green leafy vegetables and maize porridge composite meals to iron and zinc nutrition. *Nutrition*. septiembre de 2015;31(9):1117–23.
59. Oghbaei M, Prakash J. Bioaccessible nutrients and bioactive components from fortified products prepared using finger millet (*Eleusine coracana*). *J Sci Food Agric*. el 30 de agosto de 2012;92(11):2281–90.
60. Binaghi MJ, Pellegrino NR, Valencia ME. [Mineral bioaccessibility in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St) infusions and mixtures with iron fortified milk]. *Arch Latinoam Nutr*. marzo de 2011;61(1):81–6.
61. Tripathi B, Chetana, Platel K. Fortification of sorghum (*Sorghum vulgare*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) flour with zinc. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. el 1 de octubre de 2010;24(4):257–62.
62. Tripathi B, Platel K. Finger millet (*Eleusine coracana*) flour as a vehicle for fortification with zinc. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. el 1 de enero de 2010;24(1):46–51.
63. Hemalatha S, Gautam S, Platel K, Srinivasan K. Influence of exogenous iron, calcium, protein and common salt on the bioaccessibility of zinc from cereals and legumes. *J Trace Elem Med Biol*. 2009;23(2):75–83.
64. De-Regil LM, Casanueva E, Killilea DW, Viteri FE. Dialyzability of minerals in corn masa gruel (atole) fortified with different iron compounds: effects of ascorbic acid, disodium EDTA, and phytic acid. *Food Nutr Bull*. junio de 2007;28(2):198–205.
65. Bilal R, Roohi S, Ahmad T, Trinidad TP. Iron fortification of wheat flour: bioavailability studies. *Food Nutr Bull*. septiembre de 2002;23(3 Suppl):199–202.

66. Brodkorb A, Egger L, Alming M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. Nat Protoc. marzo de 2019;
67. González-Bacerio J, Hernández JR, Martínez A del M. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. Rev colomb biotecnol. el 1 de enero de 2010;12(1):124–40.
68. Merck. Pancreatin from porcine pancreas P7545 [Internet]. 8049-47-6. 2021. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p7545>
69. Cámara F, Amaro MA, Barberá R, Clemente G. Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. Food Chemistry. septiembre de 2005;92(3):481–9.
70. Rovira RF, Vilardell FT, Nogal PJÁ, Villares JMM, Segovia MJG. Biodisponibilidad mineral: evaluación. 2010;17(1):36.
71. Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. EFECTO DE LA DIGESTIÓN EN LA BIODISPONIBILIDAD DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA. Revista chilena de nutrición. septiembre de 2010;37(3):386–91.
72. Ferruzzi MG, Kruger J, Mohamedshah Z, Debelo H, Taylor JRN. Insights from in vitro exploration of factors influencing iron, zinc and provitamin A carotenoid bioaccessibility and intestinal absorption from cereals. Journal of Cereal Science. noviembre de 2020;96:103126.
73. Calderilla Jaime CM. Avances en la determinación de metales basados en la técnica de análisis en flujo multijeringa e impresión 3D [Tesis Doctoral]. Universitat de les Illes Balears; 2018.
74. Lagalante AF. Atomic Absorption Spectroscopy: A Tutorial Review *. Applied Spectroscopy Reviews. el 27 de septiembre de 2004;34(3):173–89.
75. Shubham K, Anukiruthika T, Dutta S, Kashyap AV, Moses JA, Anandharamakrishnan C. Iron deficiency anemia: A comprehensive review on iron absorption, bioavailability and emerging food fortification approaches. Trends in Food Science & Technology. el 1 de mayo de 2020;99:58–75.
76. Bothwell TH, MacPhail AP. The potential role of NaFeEDTA as an iron fortificant. Int J Vitam Nutr Res. noviembre de 2004;74(6):421–34.
77. Ministerio de Salud. Estrategia Nacional para la Prevención y Control de las Deficiencias de Micronutrientes en Colombia 2014 – 2021. 2015.
78. FAO. Nutrición e infección, salud y enfermedad Capítulo 3. <http://www.fao.org/home/es/>. 2002.

79. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr.* abril de 2009;12(4):444–54.
80. Strauss J, Thomas D. Health, Nutrition, and Economic Development. *Journal of Economic Literature.* 1998;36(2):766–817.
81. Global Nutrition Cluster. MODERATE ACUTE MALNUTRITION: A DECISION TOOL FOR EMERGENCIAS | HumanitarianResponse. www.unicef.org. 2017.
82. Departamento Nacional de Planeación DNP. Documento CONPES 3843 [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.dnp.gov.co/CONPES/documentos-conpes/Paginas/documentos-conpes.aspx>
83. ICBF-Dirección de Nutrición. Guía técnica del componente de alimentación y nutrición. ICBF; 2020.
84. González Urrutia R. Biodisponibilidad del hierro. *Revista Costarricense de Salud Pública.* julio de 2005;14(26):6–12.
85. ICBF. Distribución, Cuidado y Uso de un Alimento de Alto Valor Nutricional [Internet]. 2014. Disponible en: <https://www.icbf.gov.co/bienestar/nutricion/bienestarina>
86. Econometría SEI. Evaluación Integral de la Bienestarina Informe Metodológico de Evaluación del Impacto de la Bienestarina. ICBF; 2018.
87. INFOGEST: an international network of excellence on the fate of food in the gastrointestinal tract [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.cost-infogest.eu/>
88. Mennah-Govela Y, Singh RP. Buffering Capacity of Protein-Based Model Food Systems in the Context of Gastric Digestion. *Food Funct.* 2018;9(1).
89. Harris DC. Análisis químico cuantitativo. Barcelona: Reverte; 2007. 944 p.
90. Bings NH, Bogaerts A, Broekaert JAC. Atomic Spectroscopy: A Review. *Anal Chem.* el 15 de junio de 2010;82(12):4653–81.
91. CEPAL U. Desnutrición infantil en América Latina [Internet]. 2006. Disponible en: <https://www.cepal.org/es/publicaciones/35978-desnutricion-infantil-america-latina-caribe>
92. Eurolab España B, Morillas P. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 2016.
93. OIML. International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM) - 3rd Edition. 2007;2:150.

