



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN NUTRIMENTAL Y BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO
Y CALCIO EN GARBANZO EMPLEANDO MÉTODOS BIOLÓGICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

SANDRA FLORES ZEMPOALTECA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** Profesor: **M en C. Lucia Cornejo Barrera**
- VOCAL:** Profesor: **Dra. Iliana Elvira Gonzáles Hernández**
- SECRETARIO:** Profesor: **Q.A Verónica García Saturnino**
- 1er. SUPLENTE:** Profesor: **M en C. Jeanette Adriana Aguilar Navarro**
- 2° SUPLENTE:** Profesor: **M en C. Argelia Sánchez Chinchillas**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 4-C, edificio A, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología y Bioterio del conjunto E

ASESOR DEL TEMA:

M en C. Lucia Cornejo Barrera

SUPERVISOR TÉCNICO:

M en C. Argelia Sánchez Chinchillas

SUSTENTANTE:

Sandra Flores Zempoalteca

Esta tesis forma parte del proyecto PAPIME PE203210 Desarrollo y validación de métodos biológicos empleados en la determinación de la calidad nutrimental de un alimento, basado en ganancia de peso corporal, balance de nitrógeno y energía y su biodisponibilidad

Dedicatorias y Agradecimientos

Le dedico esta tesis a mis padres Emilia y Pedro, porque gracias a ustedes pude realizar este logro en mi vida. Gracias por estar siempre en los momentos más importantes de mi vida, por sus consejos que han sido de gran ayuda, y por todo el amor que me han demostrado aunque no me lo digan.

A mis hermanas Alejandra y Raquel, por estar conmigo a lo largo de mi vida, por todos los momentos felices que pasamos en la infancia, por sus consejos que me han ayudado a superarme y por todo su apoyo y cariño.

A mis abuelos Nicolasa † y Eligio † por todos los consejos que me dieron los cuales me ayudaron a ser una mejor persona, por todo el cariño y los momentos felices que vivimos, gracias por enseñarme a ser una buena persona, los llevare siempre en mi corazón.

A mi sobrinito Aron por traer tanta felicidad a mi vida, te dedico este trabajo y espero que cuando seas grande lo leas y lo puedas entender. Te quiero mucho.

A todos mis amigos que a lo largo de la carrera me brindaron su amistad incondicional, gracias por todos los momentos que vivimos juntos, por su apoyo en los momentos más difíciles en los cuales me demostraron su amistad. Adriana, Areli, Guadalupe, Jimena, Juan, Olga, Mariana, Sonia. Gracias por su amistad

A mis compañeros del laboratorio 4C (Roxana, Rodrigo, Donovan, Anel, Narmi y David) por su ayuda en la realización de esta tesis, gracias por su apoyo durante esta etapa de mi vida. En especial le quiero agradecer a mi compañera Diana con la cual compartí muchas experiencias agradables en la realización de esta tesis, gracias por tu amistad y paciencia.

Le doy las gracias a Lucia Cornejo Barrera por ser mi directora de tesis, por todo el apoyo que me brindo y por darme su confianza para realizar este proyecto.

Al profesor Bernardo Lucas Florentino, por el apoyo que me brindo en la realización de esta tesis, ya que me facilito varios equipos de su laboratorio, gracias por sus consejos.

A mis sinodales y asesora técnica, gracias por el tiempo que me han dedicado al leer este trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Garbanzo.....	3
1.1.2 Botánica.....	3
1.1.3 Producción.....	5
1.1.4 Valor nutrimental.....	7
1.1.5 Factores tóxicos del garbanzo	9
1.2 Proteínas.....	13
1.2.1 Digestión y absorción.....	13
1.2.3 Calidad nutrimental de una proteína	14
1.2.4 Complementación de las proteínas.....	22
1.3 Alimentos enriquecidos y fortificados	22
1.4 Biodisponibilidad	23
1.5 Aporte energético de los alimentos	24
1.5.1 Calorimetría	25
1.6 Calcio	27
1.6.1 Funciones	28
1.6.2 Absorción y excreción.....	29
1.6.3 Interacciones entre nutrimentos.....	31
1.6.4 Requerimientos y fuentes de calcio	33
1.6.5 Deficiencia	35
1.6.6 Toxicidad	37
1.7 Hierro.....	38
1.7.1 Funciones	39
1.7.2 Absorción y excreción.....	40
1.7.3 Factores que afectan la absorción de hierro	42
1.7.4 Requerimientos y fuentes	45

1.7.5 Deficiencia	45
1.7.6 Toxicidad	47
2. OBJETIVOS	48
2.1 Objetivo general	48
2.2 Objetivos específicos	48
3. METODOLOGÍA.....	49
3.1 Selección de la materia prima.	50
3.2 Acondicionamiento de la materia prima.	50
3.3 Caracterización de la materia prima.....	50
3.3.1 Método de cuantificación de hierro	50
3.3.2 Método para cuantificar calcio.	53
3.4 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP).....	56
3.5 Determinación de la relación de proteína neta (RPN)	59
3.6 Determinación de la digestibilidad aparente de una proteína mediante un método <i>in vivo</i>	61
3.7 Elaboración de dietas.	64
3.7.1 Análisis químico de las dietas.....	65
3.7.2 Densidad energética (método de la bomba calorimétrica balística).....	66
3.8 Balance de hierro y calcio	70
3.9 Balance de energía	71
3.10 Análisis estadístico.....	73
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	74
4.1. Análisis bromatológico de la harina de garbanzo.	74
4.2. Calidad proteínica de la harina de garbanzo.	75
4.3. Biodisponibilidad del hierro.....	79
4.4. Biodisponibilidad del calcio.....	81
4.5. Balance de energía	82
5. CONCLUSIONES.....	85
6. BIBLIOGRAFÍA	87
7. ANEXOS	95
7.1 Curva estándar para hierro.....	95

7.2 Curva estándar de ácido benzoico	95
7.3 Registro de peso acumulado y alimento ingerido de las ratas	96
7.4 Elaboración de dietas.	114
7.5 Valores utilizados en el cálculo del balance de hierro y calcio	118

I. INTRODUCCIÓN

México de 2007 a 2009, ocupó el tercer lugar en la producción mundial de garbanzo, con 389 mil toneladas de grano, por lo que en México el garbanzo *Cicer arietinum* L. es una de las leguminosas que se produce en mayor proporción. Su principal aprovechamiento es como alimento humano, ya que su proteína junto a la de la soya es considerada como la de mayor valor biológico (Cota *et al.*, 2010), esto tiene importancia debido a que México es un país tradicionalmente productor de garbanzo.

Otra ventaja del garbanzo entre las leguminosas es que contiene menor cantidad de factores antinutricionales como inhibidores de tripsina comparado por ejemplo, con el frijol que es una de las leguminosas más consumidas en México (Clemente *et al.*, 1999).

Debido a que el garbanzo es ampliamente producido en México se decidió utilizarlo como vehículo en la adición de fumarato ferroso (FFe) y citrato de calcio (CCa), con el objetivo de determinar la biodisponibilidad de estos minerales, además de determinar la calidad proteínica del garbanzo y realizar un balance de energía. Lo anterior, también tiene como objetivo realizar una base de datos para implementarlo en la asignatura, Laboratorio de evaluación nutrimental de alimentos, del ciclo terminal de la carrera de Química de Alimentos de la Facultad de Química.

La evaluación de la calidad proteínica del garbanzo, así como de la biodisponibilidad de las sal de fumarato ferroso y citrato de calcio fueron realizadas empleando ensayos biológicos como Relación de la Eficiencia proteínica (REP), Relación Neta de la Proteína (RNP) y Digestibilidad (D), además de que se realizó un balance de energía, para conocer el aprovechamiento de energía que las ratas tuvieron del alimento consumido.

Se decidió evaluar estas dos sales, ya que por una parte la anemia es un problema de salud pública a nivel mundial que afecta principalmente a niños y a mujeres en edad fértil (Suárez *et al.*, 2005). La anemia en niños menores de cinco años es particularmente importante por el impacto negativo que tiene sobre su desarrollo mental y su futuro desempeño social en etapas posteriores. Los niños que padecen anemia durante los primeros dos años de vida tienen un desarrollo cognitivo más lento, menor desarrollo psicomotor, y cuando ocurre en la edad adulta, menor capacidad de trabajo (Matarese, 2004).

La Encuesta Nacional de Nutrición del año 2006 reporta que aproximadamente 1, 862, 985 niños en etapa preescolar presentaron anemia, además de que la reducción en la prevalencia de anemia en los niños preescolares que habitan en la región sur del país sólo disminuyó 1.7% del año 1999 a 2006, siendo mayor la prevalencia de anemia en zonas rurales que en zonas urbanas. Por otro lado, 21, 135 mujeres, con edades entre 12 y 49 años resultaron anémicas, siendo el 20.6% mujeres embarazadas y 15.5 % no embarazadas (Olaiz, 2006).

Con respecto al calcio, es necesario tener una ingesta adecuada calcio en los alimentos para generar la masa ósea en los años de la prepubertad a la adolescencia. Las mujeres posmenopáusicas necesitan obtener suficientes cantidades de calcio para mantener la salud de los huesos, ya que durante los tres años posteriores a la menopausia en la mujer se produce una pérdida más rápida de la masa mineral ósea, la que puede llegar hasta un 2% anual (Weaver *et al.*, 1999). Además estudios recientes muestran que la suplementación con calcio y vitamina D reduce significativamente el riesgo de cáncer de mama en un 14-20% y reduce el riesgo de cáncer colorrectal un 17% en las mujeres (Astrup, 2011).

1. ANTECEDENTES

1.1 Garbanzo

El garbanzo *Cicer arietinum* L. es la segunda leguminosa en grano de importancia en el mundo. Su principal aprovechamiento se deriva de su utilización como alimento humano, preparado de muy diversas formas, de acuerdo con las costumbres de cada país.

El garbanzo es un cultivo importante en varias regiones de México. Se utiliza principalmente como alimento forrajero y para consumo humano. Es un cultivo potencialmente productivo con base en las siguientes características: como alimento para consumo humano, tiene porcentajes aceptables de proteína y carbohidratos, puede usarse como cultivo de invierno, sin interferir con los cultivos más importantes de verano o primavera como son maíz, papa, frijol, etc. y el costo de producción es bajo, comparado con el de otros cultivos (Guerrero, 1999).

Su cultivo se dio en épocas muy remotas, los primeros hallazgos arqueológicos datan aproximadamente de 5450 a.C. y fueron encontrados en Hacillar y Turquía. Algunos botánicos consideran que hubo varios puntos de origen en Asia y el Mediterráneo del este, extendiéndose rápidamente por la región mediterránea y el Sureste del continente asiático y gradualmente a las partes secas de África, sobre todo Etiopía (Nadal, 2004).

1.1.2 Botánica

El nombre científico del garbanzo es *Cicer arietinum* L.; pertenece a la familia *fabaceae*, agrupando el género *Cicer*. Es una planta pequeña que alcanza de 30 a 50 centímetros de altura y tienen un color verde-azulado, es una planta anual, las flores, que suelen ser rosadas son normalmente solitarias y se forman en las axilas de las hojas (figura 1.) sobre un pedúnculo de 2.5 a 4 cm. Las raíces son fuertes y desarrolladas y, según las especie de que se trate, el sistema radicular

puede ser profundo o superficial. Los tallos son ramificados, flexibles o rectos, erectos o rastreros. Las vainas son pubescentes, puntiagudas e hinchadas, llegando a alcanzar hasta los 3 cm de longitud, éstas pueden contener de 1 a 10 semillas. En el caso del garbanzo *Cicer arietinum* L. se encuentran genotipos que tienen hasta tres semillas por vaina. Las semillas tienen formas que varían entre globular y bilobular, siendo en algunos casos casi esféricas, presentan un pico característico recto o curvo que cubre la radícula. El garbanzo presenta diversos colores y pueden alcanzar hasta los 15 mm de longitud. (De Miguel, 1991).



Figura 1: plata de garbanzo *Cicer arietinum* L. y flor

Existen distintas variedades de garbanzos, habiéndose reconocido cuatro razas denominadas: oriental, asiática, mediterránea y eurasiática. En las razas mediterránea y eurasiática las semillas son grandes, con una cascara blanca, mientras que en las otras zonas son más pequeñas y las cascara pueden variar de color.

Existen 40 especies de garbanzos y se clasifican en 3 tipos de garbanzos:

- Kabuli: tamaño del garbanzo medio a grande, redondeados y arrugados, color claro y flores no pigmentadas. Su cultivo se localiza en la región mediterránea, América Central y América del Sur.
- Deshi: grano de tamaño pequeño, formas angulares y color amarillo o negro. Las flores y los tallos son, generalmente, pigmentados, y en algunas ocasiones también las hojas. Se cultivan principalmente en la India.

- Gulabi: grano de medio a pequeño tamaño, liso, redondeado y de color claro. (De Miguel, 1991).

1.1.3 Producción

La superficie plantada anualmente en el mundo ronda los 10 millones de hectáreas, registrándose una gran variabilidad en la superficie cosechada y los rendimientos por hectárea, debido a la presentación de sequías durante el cultivo.

De 2007 a 2009 México ocupó el tercer lugar en la producción de garbanzo, con 389 mil toneladas de grano; en primer sitio se encontró, la India, con un millón 100 mil toneladas; y en segundo lugar Turquía, con 675 mil toneladas. La lista la completaron Canadá (317 mil toneladas), Estados Unidos (122 mil toneladas), Australia (116 mil 900 toneladas), España (76 mil toneladas) y Argentina (37 mil toneladas) (Castelán, 2010).

A continuación en la tabla 1, se muestran los principales productores de garbanzo en el año 2005 según la FAO.

Tabla 1. Producción mundial de garbanzo 2005

Clasif.	País	Producción (MT)	Nota
1	India	6.000.000	*
2	Pakistán	868.200	
3	Turquía	610.000	
4	Irán, Rep. Islámica	310.000	F
5	México	240.000	F
6	Myanmar	230.000	F
7	Australia	189.000	
8	Etiopía	135.000	F
9	Canadá	97.600	
10	Siria, Rep. Árabe	55.348	

Sin símbolo = Cifra oficial * = Cifra extraoficial F = Estimación de la FAO
Fuente: Food And Agricultural Organization of United Nations: Economic And Social Department: The Statistical Division (2005)

En cuanto a la producción nacional, en México se siembran 150, 000 hectáreas de garbanzo, de las cuales 20 % corresponden a grano pequeño y café, denominado forrajero, y el 80 % son de grano blanco grande para consumo humano destinado casi en su totalidad a la exportación (Padilla *et al.*, 2008). En el noroeste de México en los estado de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur se siembra alrededor del 70 % del área nacional del garbanzo y toda dedicada al grano blanco. En los estados de Querétaro, Guanajuato, Michoacán, y Jalisco, el 95% del garbanzo que se produce es utilizado en la industria ganadera para la alimentación de aves y cerdos (Padilla *et al.*, 2008).

El INEGI reporta que en el año 2006, México cosechó una superficie de 113, 262 hectáreas con un rendimiento de 1 434 kg/ tonelada produciendo 162, 382 toneladas de garbanzo. Para el año 2008 la superficie cosechada disminuyó hasta 90, 970 hectáreas, pero presentó un rendimiento del 1 809 kg/ tonelada obteniendo una producción de 164 605 toneladas. En el año 2010 México tuvo una producción total de 171,912.31 toneladas de garbanzo, de los cuales el 23.28 % correspondieron a garbanzo forrajero y 76.72 % al garbanzo para consumo humano (SAGARPA, 2011).

Los precios del garbanzo mexicano en febrero y marzo de 2006 se fijaron en mil diez dólares por tonelada, nivel en el que se mantuvieron hasta abril de 2008, en esta fecha saltó a los mil 60 dólares por tonelada. En febrero y marzo de 2009 el precio descendió hasta los 790 dólares, pero para agosto de 2009 ya se encontraba en 950 dólares por tonelada. Según datos presentados por SAGARPA el precio del garbanzo en agosto del 2011 se encontró situado entre 17 y 23 pesos por kilogramo según el tamaño del grano en centrales de abasto de Toluca, Tuxtla Gutiérrez y Culiacán.

1.1.4 Valor nutrimental

La mayoría de las leguminosas destacan por su alto contenido proteínico, que generalmente oscila entre el 17 y el 25%, y contienen tanta energía (329 kcal /100g) por unidad de peso similar a los cereales, además presentan altos contenidos de hidratos de carbono, y son más ricos en fibra que los cereales. El contenido de grasa varía entre las oleaginosas y las legumbres secas; las primeras pueden llegar a contener hasta un 30% o incluso más; la representante más característica es la soya. En las leguminosas secas se encuentran valores pequeños de este nutrimento, destacando el garbanzo por su contenido de grasa, con cantidades que pueden superar el 5% (López, 2004).

El aporte de nutrimentos inorgánicos en las leguminosas no es despreciable, destacando el contenido de hierro y calcio, además de vitaminas como la tiamina, niacina y ácido ascórbico.

En la tabla 2 se presentan la composición química de diferentes leguminosas donde destaca el garbanzo por su contenido de grasa además de su contenido en hierro. El contenido de calcio generalmente es elevado en las leguminosas; para el caso del garbanzo es de 105 mg/100g; esta cantidad cubre con el 15% de la IDR para calcio (800 mg/día); también se observa que la cantidad de proteína es de alrededor del 20% para las leguminosas destacando la soya con un 34.1 % (Hernández y Bourges, 1996).

El contenido de aminoácidos indispensables en las leguminosas ha sido ampliamente estudiado. Se ha observado que las proteínas de las leguminosas son deficientes en aminoácidos azufrados y triptófano, pero ricas en lisina, aminoácido en el cual los cereales son relativamente deficientes.

1. IDR : Ingesta Diaria Recomendada (mg/día)

Tabla 2. Composición química de algunas leguminosas¹

leguminosa	Proteína (g)	Lípidos (g)	Hidratos de C (g)	Fibra (g)	Calcio (mg)	Hierro (mg)	Tiamina (mg)	Rivoflavina (mg)
Garbanzo	20.4	6.2	61.0	5.0	105	8.0	0.7	0.2
Frijol negro	21.8	2.5	55.4	4.0	183	4.7	0.6	0.2
Frijol bayo	22.7	1.8	58.5	4.0	200	5.7	0.7	0.1
Alubia	20.3	2.8	58.6	4.3	132	6.7	0.5	0.2
Lenteja	22.7	1.6	58.7	5.2	74	5.8	0.7	0.2
Haba	22.6	2.2	63.1	3.0	49	7.3	0.9	0.3
Soya	34.1	17.7	33.5	12.5	226	8.4	1.1	0.3

1. g/ 100 gramos Fuente: Hernández M.C, Bourges H.A, 1996.

Las proteínas del garbanzo, son una buena fuente de todos los aminoácidos, con excepción de triptófano y metionina (tabla 3) según con las investigaciones realizadas por Yust *et al.* en 2010. Su proteína junto a la de la soya, es considerada como la de mayor valor biológico entre las leguminosas en grano destinadas al consumo humano (Clemente, 1999).

Tabla 3. Contenido de aminoácidos en garbanzo.

aminoácidos	g/100g de proteína	aminoácidos	g/100g de proteína
Asp +Asn	13.2	Tyr	2.40
Glu + Gln	17.1	Val	4.26
Ser	5.99	Met	0.24
His	2.82	Cys	0.93
Gly	3.91	Ile	3.39
Thr	4.55	Trp	0.63
Arg	9.18	Leu	9.00
Ala	4.86	Phe	6.40
Pro	4.82	Lys	6.70

Fuente.Yust *et al.*, 2010

En la tabla 4 se muestra el contenido de los aminoácidos indispensables de diferentes leguminosas. Se observa que la mayoría de estas leguminosas presentan contenidos bajos en metionina y triptófano, siendo la haba y la lenteja

las que presentan los niveles más bajos de éstos, mientras que el garbanzo después de la soya presenta mayor contenido de metionina y el mayor contenido en triptófano entre las leguminosas.

Tabla 4. Contenido de aminoácidos indispensables de diferentes leguminosas

Aminoácidos g/16N	Garbanzo	Lenteja	Haba	Chícharo	Soya
Arginina	7.98	8.45	10.6	9.2	8.42
Histidina	2.57	3.81	2.8	2.5	2.55
Isoleucina	4.53	6.30	4.5	4.4	5.10
Leucina	7.63	10.9	7.7	7.4	7.72
Lisina	7.72	7.96	7.0	7.7	6.86
Metionina	1.16	0.70	0.6	1.3	1.56
Fenilalanina	6.46	6.25	4.3	4.9	5.01
Treonina	3.86	4.47	3.7	3.8	4.31
Triptófano	1.78	1.22	--	1.3	1.28
Valina	4.63	5.42	5.2	4.9	5.38

Citado por Whitaker, J.R. (1988).

El contenido de proteína de las leguminosas y en particular del garbanzo, ayuda a disminuir el costo de la dieta, al complementar y diversificar el aporte proteínico.

1.1.5 Factores tóxicos del garbanzo

Las leguminosas y el garbanzo entre ellas, contienen elementos tóxicos y antinutricionales, como son los compuestos polifenólicos o taninos, lectinas o hemaglutininas, glucósidos cianogénicos e inhibidores de tripsina. Las cantidades varían según las especies y variedades.

El término tóxico se refiere a cualquier sustancia o agente físico que actuando en pequeñas cantidades, es capaz de producir efectos adversos sobre los organismos vivos (Repetto, 2009).

Saleh *et al.*, en 2006 reportó que sustancias como las lectinas son eliminadas totalmente de las leguminosas con un proceso térmico, mientras que los taninos, e inhibidores de tripsina son disminuidos sustancialmente hasta en un 50 y 83 % respectivamente.

- **Inhibidores de proteasas.**

Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Se encuentran en casi todas las plantas y particularmente en las leguminosas (Saleh *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos, son proteínas cuyos pesos moleculares oscilan entre los 6,000 y 50,000 Daltons. Los inhibidores de proteasas en los alimentos reducen la utilización de las proteínas en el tracto digestivo. De este grupo de factores antinutricionales los más conocidos son los inhibidores de tripsina (IT), que inhibe la actividad de la enzima digestiva tripsina secretada por el páncreas.

Los inhibidores de proteasa son termolábiles, por lo que se pueden inactivar en mayor o en menor grado, por la acción de tratamientos térmicos. La estabilidad térmica de estos depende de su peso molecular y de la cantidad de uniones disulfuro presentes en la proteína (Herrera, 2003).

En la tabla 5 se indica la concentración de inhibidores de tripsina en algunas leguminosas, siendo la soya, la leguminosa que mayor contenido de inhibidor de tripsina presenta, seguido por el frijol. Como puede observarse, el garbanzo es la leguminosa que contiene menor proporción de inhibidores de tripsina (Honavar, 1962)

Tabla 5. Contenido de inhibidores de tripsina de algunas leguminosas

Leguminosas	Inhibidor de tripsina (unidades/g)
Frijol	1552
Garbanzo	220
Soya	99 000

Fuente: Honavar (1962), (citado por Aykroyd y Doughty, 1982).

- **Lectinas o Hemaglutininas**

Son glucoproteínas que se adhieren a los eritrocitos, precipitándolos por eso estas sustancias se denominan hemaglutininas o lectinas, denominación que reciben por la capacidad de algunas de ellas de unirse preferentemente a un determinado grupo sanguíneo. Este factor tóxico ha sido motivo de diversos estudios por algunos autores ya que reduce el valor nutritivo de las leguminosas, además de ser causa de envenenamiento, reducir la calidad proteínica y el crecimiento cuando se proporcionan a los animales. Por calentamiento prolongado, las lectinas de las leguminosas se inactivan (Gil, 2010).

El garbanzo contiene 6.22 unidades de hemaglutininas por mg de garbanzo pero estas son fácilmente inactivadas con la cocción del garbanzo además de que no resisten el proceso hidrolítico de la digestión (Saleh *et al.*, 2006).

- **Glucósidos cianogénicos**

Son cianohidrinias unidas a un azúcar cuya hidrólisis enzimática libera cianuro. Se presentan principalmente en forma de glucósidos (Gil, 2010).

El frijol de lima tiene la máxima concentración de cianógenos, de todas las leguminosas destinadas para consumo humano. Las variedades negras tienen mayor cantidad que las blancas. Se ha observado que otras leguminosas contienen cianógenos, pero en cantidades que no llegan a ser tóxicas (Soriano 2006).

Aykroyd y Doughty (1982), reportan que el garbanzo contiene 0.8 mg/100g de cianógenos, que está por abajo de los niveles tóxicos para humanos (3,5 mg/kg de peso corporal) y animales, además por abajo de los niveles de otras leguminosas, por ejemplo el frijol contiene 14.4 mg/100g.

- **Taninos**

Los taninos son compuestos polifenólicos, solubles en agua y con un peso molecular que oscila entre 500 y 5,000 dalton. Se clasifican en dos grandes grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados.

Los taninos hidrolizables son polímeros de ácidos fenólicos y se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos como por álcalis. Los taninos condensados se hidrolizan con dificultad y el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular.

Los taninos están involucrados en la formación de complejos de taninos con la proteína de la dieta, disminuyendo el aprovechamiento de los alimentos, inhibición de las enzimas digestivas, efectos tóxicos de los taninos en el tracto intestinal y toxicidad por la absorción de los taninos y sus productos de biotransformación, además forman complejos con iones divalentes y trivalentes (Soriano, 2006).

El garbanzo contiene 4.85 mg/g de garbanzo, y se disminuye su contenido con el tratamiento térmico de cocción hasta en un 50% (Saleh *et al.*, 2006).

En estudios realizados por Singh y Jambunathan (1981), se demostró que el contenido de compuestos polifenólicos varía de acuerdo a la parte del grano. Así pues, la cantidad de compuestos polifenólicos fue mayor que en la cubierta. En general, el 75% de los compuestos polifenólicos totales aportados provienen de la testa de las semillas.

1.2 Proteínas

Las proteínas son sustancias orgánicas complejas y de un elevado peso molecular, formadas por combinaciones de 20 aminoácidos. Todas las proteínas tienen en común cuatro elementos químicos: carbono, hidrógeno, oxígeno, y nitrógeno; en algunos casos poseen además, azufre, fósforo, yodo y cobre, entre otros elementos.

Los aminoácidos que constituyen a una proteína se pueden clasificar como indispensables y no indispensables. Los aminoácidos indispensables son aquellos que el organismo necesita adquirir de la dieta ya que no es capaz de sintetizarlos y estos aminoácidos son 8 para adultos, leucina, isoleucina, valina, triptófano, fenilalanina, metionina, treonina y lisina, mientras que para los niños son los ocho anteriores más histidina y arginina. Los aminoácidos no indispensables son prolina, serina, tirosina, cisteína, glicina, glutamina, glutamato, alanina, asparagina y aspartato. (Leninhger, 1995)

Las moléculas de proteína se organizan en cuatro niveles estructurales, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

1.2.1 Digestión y absorción

Una vez que se ha ingerido el alimento, la digestión de las proteínas se realiza por las enzimas proteolíticas del tracto digestivo. Se inicia con la pepsina presente en el estómago y continua con enzimas secretadas por el páncreas que son liberadas al duodeno, por estímulo de la enterocinasa en respuesta a la presencia de las proteínas en la luz intestinal. Estas enzimas pancreáticas (tripsina, elastasa, quimiotripsina y la carboxipeptidasa) se liberan en forma de zimógenos de mayor tamaño molecular que necesitan activarse perdiendo parte de su cadena peptídica (Kathleen, 2001).

Las peptidasas proteolíticas localizadas en el borde del cepillo (aminopeptidasa, dipeptidasas y tripeptidasas) también actúan sobre los polipéptidos, dipéptidos y tripéptidos para degradarlos hasta aminoácidos libres. Por lo general, muchos péptidos pequeños son absorbidos intactos.

Los aminoácidos se absorben a través de cuatro sistemas de transporte activo distintos: uno para cada uno de los aminoácidos neutros, básicos y ácidos, y uno para la prolina y la hidroxiprolina. El transporte de aminoácidos es controlado por el mismo tipo de cotransporte del sodio que se ha identificado para la glucosa. Los péptidos y los aminoácidos absorbidos son transportados al hígado a través de la vena porta para liberarse hacia la circulación general.

Casi toda la proteína ingerida ya se absorbió para cuando llega al extremo del yeyuno, y sólo el 1% de la misma se encuentra en las heces. Algunos aminoácidos permanecen en las células epiteliales y se utilizan para la síntesis de enzimas intestinales y nuevas células. La mayor parte de la proteína endógena de las secreciones intestinales y de las células epiteliales descamadas también es digerida y absorbida en el intestino delgado.

La proteína vegetal es digerida en menor grado que la proteína animal, en parte porque se encuentra envuelta en paredes celulares de carbohidratos por lo que está menos disponible. Algunas plantas también contienen enzimas que interfieren en la digestión de la proteína, estas enzimas deben inactivarse con calor antes del consumo. Por ejemplo, los granos de soya contienen una tripsinasa que inactiva a la tripsina, que es la principal enzima digestiva de proteínas en el intestino (Kathleen, 2001).

1.2.3 Calidad nutrimental de una proteína

No todas las proteínas que se ingieren en los alimentos son capaces de formar o reponer proteínas corporales, solo lo hacen las de mayor eficiencia de conversión. La mayor o la menor presencia de aminoácidos indispensables en una proteína va

a incidir en su valor nutritivo, siendo una proteína de buena calidad la que contiene todos los aminoácidos indispensables en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades del cuerpo, además de que es importante que estos aminoácidos puedan ser asimilados fácilmente por el organismo, mientras que una proteína biológicamente incompleta carece de uno o varios aminoácidos indispensables (López, 2004).

Hay que tener en cuenta además que el valor nutritivo puede ser modificado por aspectos tales como: a) alteración de las proteínas por procesos tecnológicos en las distintas etapas de la cadena alimentaria; b) presencia de inhibidores de tripsina o quimotripsina que dificultan la digestión y absorción de los aminoácidos.

La determinación del valor nutritivo o calidad de una proteína es útil para conocer su capacidad de satisfacer las necesidades de nitrógeno y aminoácidos para el ser humano. Se han utilizado distintos modelos para determinar la calidad proteínica de un alimento o mezcla de ellos. Dentro de los ensayos para evaluar la calidad de una proteína se tienen métodos químicos y biológicos, de los cuales los últimos son hasta el momento los más confiables especialmente en el estudio de la nutrición. También existen métodos microbiológicos utilizados para la evaluación del valor nutricional de las proteínas, incluye el empleo de microorganismos proteolíticos como *Streptococcus faecalis* subesp. *Zymogenes* y *Tetraymena pyriforms*, y técnicas de balance de nitrógeno, pero su manejo es complicado ya que el material con que se trabaja debe estar libre de otros microorganismos que pudieran influir en el bioensayo (Robinson, 1991).

A continuación se presentan algunos métodos utilizados para la determinación de la calidad de una proteína, estos se pueden clasificar en métodos biológico y métodos químicos.

Métodos biológicos

- **Relación de Eficiencia Proteica (REP)**

En 1915 Osborne, Mendel, McCollum y Davis introdujeron el concepto de REP. Este método evalúa la calidad de una proteína con base en el aumento de peso del individuo que consume una proteína. El valor de REP se define como el aumento de peso corporal de un individuo en crecimiento debido al consumo de una proteína.

En este bioensayo se deben emplear ratas macho Wistar o Sprague Dawley ya que de acuerdo a los expertos en estos bioensayos manifiestan que en los estudios de nutrición realizados con estas especies de roedor, su crecimiento refleja fielmente la calidad nutricional de su alimentación; además, las ratas son poco sensibles a los factores ambientales e infecciosos a diferencia de otros roedores. Las ratas deben ser de 21 a 23 días de edad (recién destetadas).

El periodo de ensayo es de 28 días y deben mantenerse con alimento y agua *ad libitum*, en condiciones de 12 horas de iluminación por 12 horas de oscuridad con una temperatura de 23 a 24°C y una humedad relativa entre 30 a 35 %.

Este bioensayo se ha utilizado ampliamente aunque no tiene en cuenta las necesidades proteicas de mantenimiento normal del animal. Por otra parte, la REP varía con la cantidad de alimento ingerido y la ganancia de peso no está restringida a las proteínas. No obstante, el método es muy utilizado. (Jean, 2006).

- **Relación Neta de la Proteína (RPN)**

A pesar de que el método biológico más utilizado para evaluar la calidad de la proteína es la REP, tiene el inconveniente de basarse en el crecimiento de los animales de ensayo, por lo que proteínas de baja o mala calidad nutritiva manifiestan una respuesta muy variable, ya que estas proteínas, solo pueden

cubrir una parte de las necesidades de mantenimiento de proteína. Aunado a lo anterior, si se reduce la ingestión de alimento por el animal, el valor de la REP de una proteína será mucho menor, ya que como el animal de experimentación tiene una necesidad de mantenimiento fija en lo que respecta a proteína, si se reduce la ingestión de ésta, quedará una proporción más pequeña disponible para el crecimiento cuando en ocasiones los valores de REP son negativos (Jean, 2006).

El anterior inconveniente puede solucionarse determinando la cantidad de peso corporal que se perdería si el animal de experimentación no ingiriera proteína durante el periodo de ensayo, ya que antes de que se genere el incremento de peso corporal, la proteína por ensayar debe cubrir las necesidades proteínicas de mantenimiento. Bender y Doell propusieron en 1957 el método biológico de balance corporal de RPN, que corresponden a las siglas del término en inglés Net Protein Ratio, que se traduce como Relación Neta de la Proteína y que elimina casi por completo el efecto no deseable que producen proteínas de baja calidad al realizar el método de la REP.

El método de RPN se efectúa en forma similar al de la REP, pero requiere de alimentar a un lote de animales de experimentación con una dieta libre de nitrógeno (exenta de proteína), que producirá una pérdida de peso corporal, la cual debe sumarse a la ganancia en peso al lote de animales alimentado con la dieta de la fuente de proteína a ensayar. Por lo tanto, la RPN tiene la ventaja de poder evaluar proteínas de baja calidad; además, es un método biológico relativamente corto, ya que estrictamente sólo se requiere de 10 días de experimentación, debido a que es el tiempo razonable para poder mantener con la dieta libre de nitrógeno (DLN) a los animales de este lote. Se asume que la pérdida de peso corporal del lote de ratas alimentado con la DLN, es equivalente a las necesidades proteínicas para su mantenimiento.

La relación neta de la proteína es la proporción de nitrógeno consumido que queda retenido por el organismo (Robinson, 1991).

- **Digestibilidad**

La digestibilidad es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento y es definida como la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba.

En general se conoce que los alimentos proteínicos de origen animal son más digeribles que los de origen vegetal. Lo anterior se atribuye a que los alimentos de origen animal tienen un menor contenido de fibra y como consecuencia una mayor absorción de los nutrimentos, a diferencia de los alimentos de origen vegetal, los cuales tienen un contenido de fibra significativo, en especial los alimentos vegetales no procesados (Soriano, 2006).

Otros factores que pueden influir en la digestibilidad de la proteína son los siguientes:

- ❖ El procesamiento térmico en ocasiones puede mejorar la digestibilidad, debido a la desnaturalización de las proteínas nativas y hacerlas más susceptibles a la acción de las enzimas digestivas; sin embargo, lo anterior se puede revertir cuando hay un sobreprocesamiento, ya que se puede modificar la solubilidad de las proteínas y hacerlas poco digeribles.
- ❖ Algunos alimentos de origen vegetal, pueden contener factores tóxicos y antinutrientales que disminuyen la capacidad de absorción de la mucosa intestinal o bien, disminuyen la biodisponibilidad de los aminoácidos (Yust *et al.*, 2003).

La digestibilidad de una proteína alimenticia se puede determinar por procedimientos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vitro* simulan las condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo. A pesar de ser más prácticas, en muchas ocasiones este tipo de métodos aunque son más

precisos y reproducibles, pueden dar resultados inexactos. Por lo tanto, hasta la fecha los ensayos *in vivo* para la digestibilidad, son los más confiables (Carias *et al.*, 1995)

La digestibilidad aparente (Da) de las proteínas se define como el porcentaje de nitrógeno ingerido que no es desechado en las heces. Para el cálculo de la digestibilidad real hay que corregir el dato anterior restando el nitrógeno fecal medido con una dieta carente de nitrógeno. La digestibilidad aparente puede expresarse como

$$Da = \frac{NI - NF}{NI}$$

Donde: NI es nitrógeno ingerido y NF es nitrógeno fecal (Adrian, 2000).

➤ **Valor Biológico (VB)**

El valor biológico de una proteína es la fracción de nitrógeno absorbido que es retenido por el organismo y esto representa la capacidad máxima de utilización de una proteína. Una proteína tiene mayor valor biológico, cuando tiene mayor capacidad de brindar nitrógeno al organismo.

El valor biológico de una proteína es alto cuando contiene aminoácidos indispensables en porciones adecuadas, ya que un papel fundamental de las proteínas de la dieta es el aporte de este tipo de aminoácidos. Proteínas animales como la albumina de huevo tiene un valor biológico alto, próximo a 100, mientras que las proteínas vegetales presentan valores bajos, por ejemplo, el gluten de trigo tiene un valor biológico de tan solo 42% en comparación con proteínas de referencia (caseína).

Este método utiliza técnicas de balance de nitrógeno para determinar la fracción del nitrógeno absorbido que es retenida por el organismo para su utilización.

$$VB = \frac{NI - (NF - NU)}{NI - NF}$$

Dónde: NI es nitrógeno ingerido, NF es nitrógeno fecal y NU es nitrógeno eliminado en la orina (Hernández, 1999).

Métodos químicos

La calidad de una proteína también se puede evaluar químicamente, cuantificando la cantidad de aminoácidos que la componen. Dichas evaluaciones químicas como el análisis de la composición de aminoácidos por cromatografía, no consideran la digestibilidad de la proteína; por lo tanto, se corre el riesgo de sobrestimar la calidad de una proteína empleando exclusivamente dichos métodos (Adrian, 2000).

➤ Calificación química o aminoácido limitante

Se denomina calificación química a la relación del aminoácido que se halla en menor proporción en la proteína de un alimento, con respecto al mismo aminoácido de una proteína de referencia(aminoácido limitante). Se puede expresar en fracción o en porcentaje con la siguiente ecuación.

$$\text{valor químico} = \frac{\text{mg de aa indispensable por g de proteína a analizar}}{\text{mg de aa indispensable por g de proteína de referencia}}$$

Así, el aminoácido con la más baja calificación, es el aminoácido limitante de una proteína. En general el triptófano, treonina, lisina, metionina y cisteína suelen ser los aminoácidos limitantes de los alimentos habituales.

El comité de expertos de la FAO/OMS ha valorado las necesidades de aminoácidos en los niños a partir de los datos obtenidos mediante experimentos alimentarios. Sin embargo, a pesar de que la necesidad de aminoácidos

indispensables disminuye con la edad, las recomendaciones de la FAO/OMS para adultos se ha basado hasta hace poco tiempo en los datos obtenidos con niños. Utilizando los patrones de la FAO/OMS de 1985 que indican la cantidad adecuada de aminoácidos que deben consumir los niños y los adultos.

Sin embargo, este método tiene una desventaja, ya que los aminoácidos medidos por análisis químicos pueden no estar disponibles biológicamente, ya que primero se tiene que digerir y asimilar a los aminoácidos antes de que sean una fuente eficaz para la síntesis de proteína corporal. No obstante, los datos basados en las necesidades de aminoácidos permiten establecer comparaciones entre la eficacia de diversas proteínas como fuentes de alimentación humana (Soriano, 2006).

➤ **Valor químico corregido por digestibilidad**

Este método fue propuesto por el comité de la FAO/OMS en 1991. El PDCAAS (protein digestibility–corrected amino acid score) de una proteína en la dieta se calcula mediante la comparación de aminoácidos de la proteína de la dieta con un patrón de referencia. Cada aminoácidos es anotado en relación con el patrón, y la consiguiente calificación se corrige con un coeficiente de digestibilidad de la proteína. Los aminoácidos limitantes en la proteína, que se refleja en el menor valor del PDCAAS, determina el resultado final de las proteínas de la dieta.

Por ejemplo, si la proteína de un alimento tiene un valor químico de 0.70 de su aminoácido limitante y el 80% de su proteína es digerible el PDCAAS para este alimento sería 0.56, que se obtiene de multiplicar el valor químico 0.70 por la digestibilidad verdadera 0.80.

El valor máximo del PDCAAS es 1 y corresponde a la proteína de la leche, el huevo y la soya. (Darragh, 2000).

1.2.4 Complementación de las proteínas

La mezcla adecuada de alimentos en suficiente cantidad permite la complementación entre unos y otros para que se tenga una cantidad adecuada de aminoácidos indispensables. (Velásquez, 2006).

Cuando se mezclan dos proteínas incompletas, de tal forma que el aminoácido limitante en una se suple con el aporte de la otra, en la cual el mismo aminoácido está en abundante cantidad, tales mezclas mejoran el valor de las proteínas asimilables entre el 50 y 90%, respecto a las proteínas de los alimentos consumidos por separado (López, 2004).

Por ejemplo, el maíz es deficiente en triptófano y lisina; el arroz, en lisina y treonina; y el trigo, en lisina, por lo tanto, la alimentación a base de cereales debe incluir leguminosas, ya que éstas contienen hasta 25% de proteínas ricas en lisina y compensan la deficiencia de los cereales.

Las proteínas de un cereal y las de una leguminosa tienen un valor biológico de 40 y 60 %, respectivamente, la leguminosa, que contiene lisina, se complementa con la metionina, que posee el cereal, de manera que ambos alimentos, juntos, constituyen una proteína de alto valor biológico (López, 2004).

1.3 Alimentos enriquecidos y fortificados

Una de las respuestas de la industria alimentaria a la cuestión de ciertas situaciones de carencia en algún nutrimento o bien para contribuir al mantenimiento del estado de salud del organismo humano, ha sido la elaboración de dos tipos de alimentos:

- ❖ Alimentos enriquecidos. Son aquellos a los que se le ha añadido una cantidad específica de nutrimento para mejorar el contenido natural de los alimentos convencionales. De este modo se puede contribuir de una manera más eficaz a la IDR de algunos nutrimentos; contribución que se

considera significativa cuando estas representan un 15% de estas recomendaciones (Bello, 2005).

- ❖ Alimentos fortificados. Aquellos que llevan adicionados cantidades extras de aquellos nutrimentos que no están presentes en el alimento convencional de manera natural, adicionando nutrientes de bajo costo, como sales inorgánicas (calcio, hierro, yodo y flúor), aminoácidos (lisina, triptófano y metionina) y vitaminas (A, B1, B2, C, D y niacina) (Aranceta, 2005).

Otro procedimiento de fortificación consiste en aislar las proteínas de la soya, semilla de girasol, cacahuete, albúmina de huevo, avena, levadura y otras fuentes para enriquecer los alimentos.

Los alimentos enriquecidos y fortificados surgieron en parte para compensar las pérdidas tecnológicas de algún nutriente; por la necesidad de aportar nutrimentos en cantidades suficientes para cubrir las necesidades incrementadas por alguna situación fisiológica particular como niños en crecimiento, madres en periodo de gestación o de lactancia, personas ancianas, deportistas que realizan esfuerzos físicos extras, etc. Ingerir alimentos enriquecidos prevendría enfermedades como anemia, pelagra, bocio y caries dental, entre otras (Bello, 2005).

En México este tipo de alimentos son regulados por la “norma oficial mexicana 086-ssa1-1994, bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales”. En donde el término adicionar, se define como, añadir uno o más nutrimentos, contenidos o no normalmente en el producto.

1.4 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad ha llegado a ser un término de utilidad en los últimos años para describir el estado químico o fisicoquímico de los minerales dentro de la luz del intestino delgado. Se entiende por biodisponibilidad la proporción de un

determinado nutrimento que puede ser absorbida y utilizada por el organismo de los alimentos ingeridos que lo contienen.

La biodisponibilidad es algo inherente a cada nutrimento. Los factores que la afectan y el grado con que lo hacen varían enormemente de un nutriente a otro, pues los mecanismos de absorción, distribución, almacenamiento, utilización orgánica y excreción son propios de cada nutriente (Moreno, 2000).

En cada nutriente es posible distinguir dos tipos de factores que pueden afectar su biodisponibilidad: los dietéticos y los fisiológicos. Entre los factores fisiológicos se encuentran, la salud del individuo, gestación o lactancia o factores individuales como, el sexo, la raza, edad, etc.

Dentro de los factores dietéticos, los más destacados son: la cantidad de nutriente presente en el alimento, la forma química del mismo y la presencia de otros componentes del alimento que puedan interactuar con él.

Los tipos de interacciones que se pueden presentar entre los componentes de alimentos son muy variados. Básicamente se pueden describir dos tipos de interacciones, aquellas por las que un componente incrementa la utilización orgánica de un nutriente (sinergismo), y la contraria, es decir, cuando la presencia de un componente alimentario reduce la utilización orgánica de un nutriente concreto (antagonismo) (Moreno, 2000).

1.5 Aporte energético de los alimentos

El organismo utiliza energía para cubrir sus funciones vitales (metabolismo basal), para realizar ejercicio y otras actividades físicas y para realizar el metabolismo de los productos obtenidos de la dieta. Así la necesidad primordial del organismo es la obtención de energía, sin la cual es imposible su funcionamiento.

El consumo energético del organismo se mide en kilocalorías o en kilojulios y depende de varios factores entre ellos, la edad, el peso, la salud o enfermedad, la actividad realizada, la talla y el estado nutricional.

La situación ideal es un balance entre el gasto energético y el aporte alimentario. Si existe un inadecuado aporte por un periodo prolongado, se produce alteración en el funcionamiento general. Si la dieta suministra energía insuficiente, se utilizan las reservas de glucógeno y del tejido adiposo; al contrario, si la ingesta es excesiva el individuo enfrenta un exceso de peso.

En la digestión, las proteínas, hidratos de carbono y las grasas se desdoblan en sus componentes estructurales más simples, los cuales se absorben en el intestino delgado, pasan a la sangre y de ella a los tejidos. En los tejidos, esos componentes se oxidan nuevamente, liberando la energía química almacenada en sus moléculas, esa energía química es captada por moléculas especiales en forma de adenosín trifosfato (ATP). El ATP es la energía inmediata que utiliza la célula en todas sus funciones.

Proteínas, hidratos de carbono, y grasas son los tres nutrimentos que aportan energía al organismo, pero el aporte energético de estos no es idéntico. Los hidratos de carbono y proteínas se considera que aportan aproximadamente 4 Kcal/g, en tanto que los lípidos aportan unas 9 Kcal/g, esto se ha comprobado científicamente por la combustión total de uno gramo de cada nutrimento. (Moreno, 2000).

1.5.1 Calorimetría

Los alimentos que consume el hombre aportan una cierta cantidad de energía, que según la ley de Hess será idéntica, independientemente del modo en que se libere, dependiendo exclusivamente de la sustancia original y del producto o productos resultantes. Por tanto, para determinar la cantidad total de energía que aporta un alimento podemos emplear una bomba calorimétrica en la que se

produce la combustión total de los nutrientes con el consiguiente consumo de oxígeno y liberación de CO₂. La energía calorífica que se libera de esta combustión es la energía gruesa o energía máxima que puede liberar ese alimento. Teóricamente ha de ser igual a la producida en los fenómenos metabólicos de oxidación de esos mismos alimentos en un organismo vivo, según la mencionada ley de Hess; pero no toda la energía de un alimento es aprovechable para el organismo, ya que sólo el 98 % de los carbohidratos, 95 % de la grasa y 92 % de las proteínas son digeridas y absorbidas. En la figura 2, se ilustra lo que ocurre con la energía del alimento desde que se ingiere hasta su utilización final.

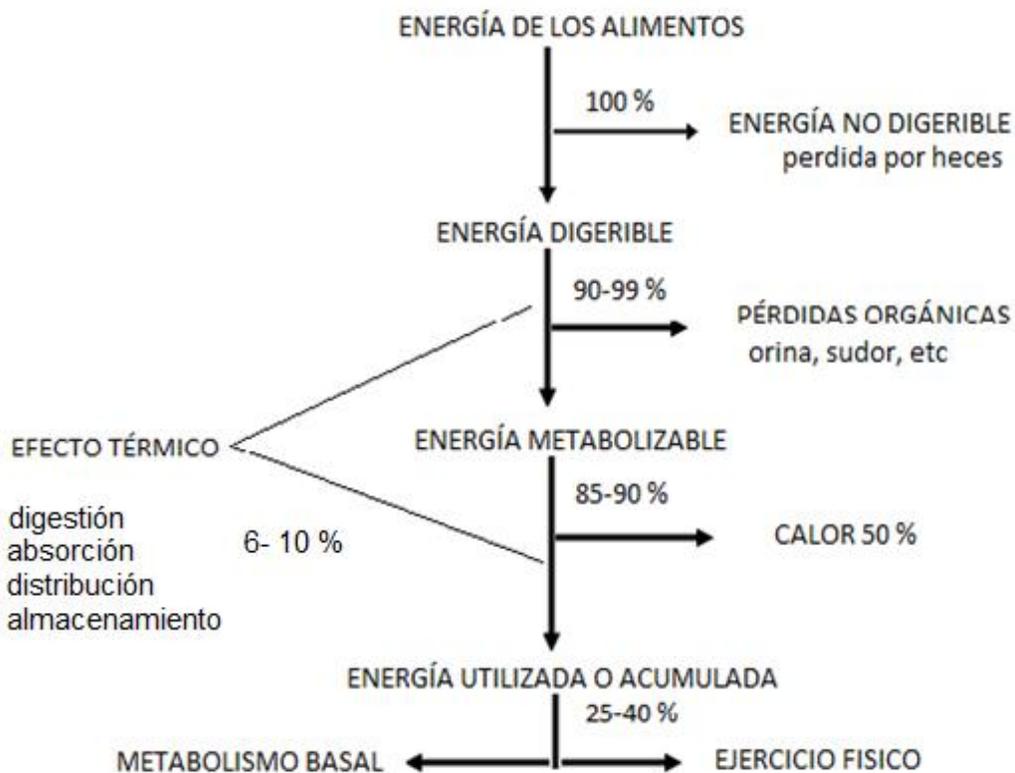


Figura 2. Utilización de la energía ingerida de los alimentos (Moreno, 2000).

Sin embargo, en el metabolismo de las proteínas el rendimiento energético es inferior, ya que no se metabolizan totalmente, siendo los productos del mismo urea y amoníaco. Otro factor a tener en cuenta a la hora de valorar la energía suministrada por un alimento al organismo es su digestibilidad, que suele ser de un 95% en energía (Moreno, 2000).

1.6 Calcio

El calcio es el mineral más abundante en el cuerpo humano. Alrededor del 99% del calcio en el cuerpo se encuentra en los huesos y los dientes, mientras que el otro 1% se encuentra en la sangre y los tejidos blandos. Los niveles de calcio en la sangre y el líquido que rodea a las células (líquido extracelular) deben mantenerse dentro de un rango de concentración muy estrecho para un funcionamiento fisiológico normal. Las funciones fisiológicas del calcio son tan vitales para la supervivencia, que cuando es necesario el cuerpo desmineraliza al sistema óseo para mantener niveles normales de calcio en la sangre cuando la ingesta de este es inadecuada. Por lo tanto, una ingesta de calcio adecuada en la dieta, es un factor crítico para mantener un esqueleto sano (Weaver *et al.*, 1999).

El calcio que no está en los huesos o en los dientes, está ampliamente distribuido en los tejidos blandos; no obstante, donde el calcio alcanza su concentración más alta es en la sangre, por ejemplo, los animales superiores tienen 10 mg de calcio por cada 100 mL de suero. Parte del calcio sanguíneo se encuentra ligado a proteínas formando un complejo coloidal, esta es la fracción no difusible, debido a que el gran tamaño de las partículas coloidales impiden su paso a través de las membranas celulares. La mayor parte del calcio del suero, alrededor del 60%, se encuentra en enlaces inorgánicos, en forma de fosfato o de bicarbonato. Esta es la fracción difusible y tiene un particular interés en nutrición debido a que se ioniza y se dispone de ella con más facilidad que de la fracción coloidal (Lloyd, 1999).

El nivel mínimo de calcio en la sangre está regulado por la hormona paratiroides y no por la ingestión de calcio en la dieta. Cuando es necesario, la hormona paratiroidea mantiene un nivel mínimo de calcio en sangre movilizando calcio del hueso. Además de aumentar la cantidad de calcio liberado por el hueso, la hormona paratiroidea estimula la resorción renal de este elemento y la absorción intestinal. Durante la hipercalcemia se estimulan las células del tiroides que secretan calcitonina, que tiene un efecto opuesto al de la hormona paratiroidea y disminuye el nivel de calcio sérico, por todo lo anterior es evidente que la hormona paratiroides tiene un papel central en el mantenimiento de los niveles normales de calcio (Campbell, 2008).

Recientes estudios clínicos aleatorizados y meta-análisis han proporcionado importantes conocimientos sobre los aspectos del calcio en la dieta que va mucho más allá de su papel en la salud ósea y dental. Un ensayo aleatorio controlado mostró que la suplementación con calcio y vitamina D redujo significativamente el riesgo de cáncer de mama en un 14-20%, y redujo el riesgo de cáncer colorrectal un 17%. Estos efectos han sido sugeridos por la observación estudios durante muchos años. Pero hay otros hallazgos que dan motivos para la cautela. Un meta-análisis en donde participaron 28,072 participantes se encontró que el calcio o suplementos de calcio más vitamina D aumenta el riesgo de infarto de miocardio en un 24% (Astrup, 2011).

1.6.1 Funciones

El calcio de los tejidos blandos, además de iniciar el proceso de coagulación de la sangre y de activar diversas enzimas, ejerce otra serie de funciones reguladoras.

- ❖ En la membrana celular el calcio está íntimamente unido a la lecitina, controlando la permeabilidad de la membrana celular y con ello el paso de nutrientes a la célula.

- ❖ El calcio estimula la contracción muscular; un exceso de calcio en la sangre puede dar lugar a un estado de contracción tónica conocido como rigor cálcico, mientras que niveles bajos pueden producir contracciones espasmódicas conocidas como tetania.
- ❖ El calcio interviene en la regulación de la transmisión del impulso nervioso de una célula a otra.
- ❖ La presencia de calcio es necesaria para la absorción de la vitamina B₁₂ por la pared intestinal
(Vázquez, 2005).

1.6.2 Absorción y excreción

Entre el 30% y el 40% del calcio de la dieta se absorbe en el intestino delgado y sólo alrededor del 10% en el colon. La absorción más rápida después de una comida ocurre en el duodeno, donde prevalece un medio ácido (pH<7). La absorción es más lenta en la parte restante del intestino delgado en virtud del pH alcalino, pero la cantidad de calcio que se absorbe en realidad es mayor en los segmentos más bajos del intestino delgado incluyendo al íleon. La absorción de calcio varía de acuerdo con el consumo del mineral. Cuando la ingesta de calcio se reduce, su absorción se incrementa; y cuando el consumo de calcio aumenta la absorción disminuye (Campbell, 2008).

El calcio se absorbe por dos mecanismos de transporte: transporte activo, el cual opera predominantemente a concentraciones lumbales baja de iones calcio, y transporte pasivo o desplazamiento paracelular, el cual funciona a concentraciones lumbales altas de los iones calcio. El mecanismo de transporte activo se presenta principalmente en el duodeno y en la porción principal del yeyuno, este es saturable, y es controlado por la acción de la 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D₃) que es la forma hormonal activa de la vitamina D; esta aumenta la captación de calcio en el borde en el cepillo de la célula de la mucosa intestinal por un mecanismo no del todo comprendido. (Colette *et al.*, 1986). El transporte pasivo que es no saturable e independiente de la vitamina D,

tiene lugar en toda la longitud del intestino delgado. Cuando se consumen grandes cantidades de calcio en una sola comida, por ejemplo de un alimento lácteo o un suplemento, gran parte del elemento que se absorbe lo hace mediante este mecanismo pasivo (Kathleen, 2001).

El calcio es absorbido sólo en estado ionizado y la absorción incompleta del calcio se debe en parte a la formación de complejos insolubles en la luz intestinal. De esta manera, las sustancias que forman complejos con el calcio, como el fosfato, citrato, oxalato, sulfato y ácidos grasos, reducen la biodisponibilidad del calcio iónico para su absorción (Allen, 1982).

El ácido oxálico, también conocido como oxalato, es el inhibidor más potente de la absorción de calcio debido a que se forma oxalato de calcio que es insoluble en el tubo digestivo, por ejemplo sólo se absorbe el 5% de calcio presente en las espinacas donde se encuentra en altas concentraciones el ácido oxálico.

El ácido fítico es un inhibidor menos potente de la absorción de calcio que el oxalato, este se encuentra principalmente en las cáscaras de los granos de cereales, e igualmente forma un compuesto insoluble con calcio (fitato de calcio) que no se puede absorber el organismo. Sólo fuentes concentradas de fitato, como el salvado de trigo o frijoles secos, reducen considerablemente la absorción de calcio (Requejo, 2000).

La excreción del calcio se lleva a cabo principalmente por las heces y si los niveles sanguíneos de calcio son muy altos (más de 70 mg/L) el exceso se elimina por la orina, aunque también se ha encontrado que se pierden pequeñas cantidades de este mineral por medio del sudor, (alrededor de 15-35 mg/día en adultos y en adolescentes) (Rianon *et al.*, 2003).

El calcio fecal procede de la parte no absorbida de la dieta y restos celulares de la mucosa, saliva, jugos digestivos y bilis. En general, los niveles de calcio urinario están correlacionados con los niveles de ingesta del mineral, viéndose también

influenciados por determinados factores dietéticos y hormonales como los que se presentaran en el siguiente apartado.

1.6.3 Interacciones entre nutrimentos

Como fue mencionado, los niveles de calcio en el hombre dependen de la absorción a través de la pared intestinal y esta a su vez depende de la presencia de vitamina D, pero también depende de otros factores como la acidez gástrica y del aporte de proteínas, fibra y otros sólidos de la dieta (Matti, 1998). A continuación se presentan algunos nutrimentos que intervienen en la absorción del calcio.

Proteína: Se ha demostrado que la proteína dietética, particularmente la de origen animal, tiene un efecto positivo sobre la excreción urinaria de calcio (Barzel, 1998). Eso ocurre especialmente en proteínas con un alto contenido de aminoácidos azufrados, como la cisteína o la metionina, donde la ruptura de los aminoácidos mismos libera grupos sulfato que causan acidez e incrementan la excreción del calcio en la orina (Whiting *et al.*, 1997).

Fibra: La fibra alimentaria aminora la absorción de calcio, esto representaría un problema para las personas vegetarianas que consumen más de 30 gramos al día. Estudios *in vitro* demuestran que la habilidad de la fibra dietética para disminuir la disponibilidad mineral depende del tipo y de la cantidad de fibra en la dieta, produciéndose diferencias en los resultados obtenidos en función de las condiciones experimentales de estudio (Idouraine *et al.*, 1996). Fibras como las de trigo, avena o manzana pueden disminuir la absorción del calcio (Bosscher *et al.*, 2003).

Fósforo: El fósforo, que normalmente se encuentra en alimentos ricos en proteínas, tiende a disminuir la excreción de calcio en la orina. Sin embargo, los alimentos ricos en fósforo también tienden a aumentar el contenido de calcio de las secreciones digestivas, provocando una pérdida de calcio mayor en

heces. Por lo tanto, el fósforo no compensa la pérdida neta de calcio asociado con una ingesta mayor de proteínas (Anderson y Garner, 1996).

La relación óptima entre el calcio y el fósforo de las dietas puede deducirse de la relación que guardan estos dos elementos en el hueso, que es de 2:1 respectivamente. Para la mayoría de las especies el margen apropiado se encuentra entre 1:1 y 2:1. Las dietas con estas proporciones han resultado satisfactorias para la calcificación normal del hueso (Lloyd, 1999).

Actualmente se ha dado un incremento en la ingesta de fosfatos proveniente de los refrescos y de los aditivos presentes en los alimentos, esto ha causado preocupación entre algunos investigadores acerca de las consecuencias para la salud ósea. El efecto de la alta ingesta de fósforo en el equilibrio del calcio y en la salud ósea es claro, actualmente, la sustitución de leche u otras fuentes de calcio por bebidas gaseosas en la dieta, es causa de preocupación con respecto a la salud de los huesos en adolescentes y adultos (Calvo, 2000).

Vitamina D: La relación entre calcio y fósforo tiene poca importancia si la cantidad de vitamina D en la dieta no es la adecuada. La vitamina D en su forma hormonal activa, estimula la absorción intestinal del calcio a través de una serie de pasos complejos, entre los que figura el transporte hacia la sangre, a través del borde en el cepillo de la mucosa. Los consumos de vitamina D pequeños o la exposición inadecuada a la luz solar mitiga la absorción de calcio, sobre todo en los ancianos (Kathleen, 2001).

Magnesio: El calcio y el magnesio son antagonistas, es decir, se contrarrestan entre sí. Los suplementos de magnesio pueden disminuir los niveles de calcio ya que la absorción del magnesio también depende de la vitamina D (Tolonen, 1995).

Sodio: El alto consumo de sodio causa una mayor pérdida de calcio en la orina, posiblemente debido a la competencia entre el sodio y el calcio para la

reabsorción en los riñones o por un efecto del sodio sobre la hormona paratiroidea (PTH). Cada incremento de 2.3 gramos de sodio (6 gramos de sal, NaCl) se ha encontrado que se excreta por el riñón 24-40 mg de calcio en la orina, por esta razón el sodio en la dieta tiene un gran potencial para influir en la pérdida de calcio en los huesos. En mujeres adultas, cada gramo extra de sodio consumido por día se proyecta para producir una tasa adicional de pérdida de masa ósea de 1% por año. Aunque los estudios en animales han demostrado la pérdida de masa ósea hueso debido a una ingesta elevada de sal, no se han llevado a cabo ensayos clínicos controlados para confirmar la relación entre la ingesta de sal y la pérdida ósea en los seres humanos (Matkovic *et al.*, 1995).

Cafeína: La cafeína en grandes cantidades aumenta el contenido de calcio en la orina por un corto tiempo. Sin embargo, la ingesta de cafeína de 400 mg/día no modificó significativamente la excreción urinaria de calcio de más de 24 horas en las mujeres premenopáusicas, en comparación con un placebo (Barger *et al.*, 1990). En otro estudio observacional se encontró una pérdida acelerada de masa ósea en mujeres posmenopáusicas que consumían menos de 744 mg de calcio/día y se informó que bebían 2-3 tazas de café/día (Harris, 1994).

Un estudio más reciente en el que se midió el consumo de cafeína no encontró ninguna asociación entre la ingesta de cafeína y la pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas. En promedio, una taza de café de 240 mL disminuye la retención de calcio sólo 2.3 mg (Lloyd, 2000).

1.6.4 Requerimientos y fuentes de calcio

El calcio es uno de los minerales que mayores requerimientos presenta. El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zúbiran reporta un valor de IDR¹ de 800 mg para adultos, para niños de 800-1000mg y para mujeres embarazadas y lactantes de 1200 mg.

Tabla 6. Consumos alimentarios de referencia para calcio

Grupo según etapa de vida	Calcio (mg/día)		Grupo según etapa de vida	Calcio (mg/ día)	
	AI	UL		AI	UL
1-3 años	500	2 500	Embarazo		
4-8 años	800	2500	≤18 años	1 300	2 500
9-13 años	1 300	2 500	19-30 años	1 000	2 500
14-18 años	1 300	2 500	31-51 años	1 000	2 500
19-30 años	1 000	2 500	Lactancia		
31-50 años	1 000	2 500	≤ 18 años	1 300	2 500
51-71 años	1 200	2 500	19-30 años	1 000	2 500
>70 años	1 200	2 500	31-50 años	1 000	2 500

National Academy of Sciences, Food and Nutrition Board . Dietary Reference Intakes: Recommended Levels for Individual Intake. The National Academy of sciences, 1998.Citado por Kthleen, (2001)
AI. Consumo adecuado. UL. Nivel de consumo superior tolerable

Los consumos adecuados de calcio recomendados por la Food and Nutrition Board (Institute of Medicine, 1998) se basan en estimados de los requerimientos de ambos géneros durante el ciclo de vida, debido a que existen varios periodos en la vida de la mujer, en los que es decisivo ingerir calcio, es decir, durante la prepubertad, la adolescencia, la posmenopausia, el embarazo, y la lactancia (Yates, 1995).

También se han establecido por primera vez los niveles de consumo superior tolerables (UL) para este nutrimento. Estos consumos alimentarios de referencia se muestran en la tabla 6.

Dentro de los alimentos que presentan una fuente rica de calcio (véase tabla 7), se encuentran los productos lácteos, que contribuyen hasta en un 70% de la ingesta total del mineral en la dieta de los países occidentales (Guéguen y Pointillart, 2000). El consumo de leche y derivados lácteos, además de mejorar la absorción del calcio, conlleva a una ingesta simultánea de fósforo, que es esencial para la deposición ósea.

Los cereales pueden aportar hasta un 22% del calcio total diario. Las leguminosas, contienen importantes cantidades de calcio, aunque su disponibilidad puede ser baja debido a la presencia de compuestos como fitatos y oxalatos que contribuyen en forma negativa a la disponibilidad del elemento (Messina, 1999).

Otras fuentes alimentarias de calcio son las hojas oscuras de vegetales verdes como el brócoli, la col, hojas de mostaza y hojas de nabo; sin embargo, la biodisponibilidad del calcio debe ser tomada en consideración ya que se han encontrado componentes que inhiben la absorción del calcio en los alimentos de origen vegetal; como el ácido oxálico y el ácido fítico mencionados anteriormente. Las carnes y el pescado aportan sólo pequeñas cantidades del mineral.

Tabla 7. Contenido de calcio de algunos alimentos

Alimento	mg	Alimento	mg
Yogurt bajo en grasa, con fruta	345	Almendras ¼ taza	92
Leche descremada, 1 taza	302	Frijoles cocidos, blancos ½ taza	64
Queso cheddar, 28g	240	Naranja, 1 mediana	52
Salmon enlatado con espinas, 100g	185	Brócoli cocinado, fresco ½ taza	36
Helado de crema, 1 taza	176	Pan, de trigo entero, 1 rebanada	32
Queso cottage, 2% de grasa, 1 taza	155	Queso crema, 2 cucharadas	23
Espinaca congelada, cocida, ½ taza	137	Harina de avena, cocinada, 1 taza	19
Tofu, ½ taza	130	Platano, 1 mediano	7
Leche en polvo, sin grasa, 2 cucharadas	104	Carne de res molida, magra, 85g	4

Reproducido de United States Department of Agriculture (USDA). Composition of Foods. USDA Handbook No 8 Series. Washington D., USDA, 1970-1986. Citado por Kathleen, (2001)

1.6.5 Deficiencia

Un nivel bajo de calcio en la sangre por lo general implica una función anormal de la glándula paratiroidea (PTH) y rara vez se debe a una baja ingesta de calcio dietético ya que el esqueleto ofrece una gran reserva de calcio para mantener los niveles normales de la sangre. Otras causas de niveles anormalmente bajos de

calcio en la sangre son la insuficiencia renal crónica, deficiencia de vitamina D, y niveles bajos de magnesio en la sangre que se producen principalmente en los casos de alcoholismo severo (Anderson, 1988).

Un bajo consumo de calcio es un factor importante en varias enfermedades crónicas, como el cáncer de colon y la hipertensión, enfermedades que suelen presentarse en las sociedades occidentales. Los datos de los Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) demuestran que las ingestiones adecuadas de calcio, magnesio, potasio y otros micronutrientes provenientes de productos lácteos bajos en grasa, frutas y vegetales, reducen sustancialmente la presión arterial en individuos con hipertensión y evitan el desarrollo de ésta (Appel *et al.*, 1997).

El efecto de la carencia del mineral conlleva a una insuficiente mineralización de la matriz ósea, originando raquitismo, manifestado por el retardo en el crecimiento y desarrollo anormal de los huesos en la etapa infantil y adolescente, contribuyendo a una posible osteoporosis en la edad adulta. La osteoporosis está definida como una enfermedad sistemática del esqueleto caracterizado por una baja masa ósea y deterioro del tejido óseo, que aumenta la fragilidad del hueso y por consecuencia mayor susceptibilidad a las fracturas (Prentice, 1997).

Ante la deficiencia de calcio, la suplementación puede contribuir al aumento de las cantidades consumidas de este mineral. Se recomiendan suplementos de calcio no superiores a 500 mg/día, con la excepción de personas que no toman ningún derivado lácteo (Schlenker, 1994), ya que dosis mayores pueden afectar negativamente la absorción de hierro reduciéndola hasta en un 50% (Hallberg, 1991).

1.6.6 Toxicidad

Un consumo alto de calcio (2, 000 mg o más por día), sobre todo ante un alto nivel de vitamina D, representa una causa potencial de hipercalcemia. Esta toxicidad puede originar una calcificación excesiva en los tejidos blandos, sobre todo en los riñones, lo cual puede ser letal. Los altos consumos de calcio también interfieren en la absorción de otros cationes divalentes, como zinc y magnesio (Argiratos y Sam, 1994).

La hipercalcemia leve puede ser asintomática o puede resultar en la pérdida de apetito, vómitos, estreñimiento, dolor abdominal y sed. Una hipercalcemia más grave pueden dar lugar a delirio, confusión, coma, y si no se trata, la muerte. La hipercalcemia sólo se ha reportado con el consumo de grandes cantidades de suplementos de calcio por lo general en combinación con antiácidos (Food and Nutrition Board, 1997).

Otros posibles efectos adversos del consumo excesivo de calcio, que no tienen un efecto tóxico en sí, incluye estreñimiento y a la formación de cálculos renales. El estreñimiento es común en las mujeres ancianas que ingieren suplementos de calcio, pero es rara la frecuencia de cálculos renales en quienes los consumen. Aunque el riesgo de formar cálculos renales es mayor en individuos que presentan calcio en concentraciones elevadas en la orina, esta condición no suele estar relacionada con la ingesta de calcio, sino más bien a una mayor excreción de calcio por los riñones. En general, una mayor ingesta de calcio en la dieta se ha asociado con un menor riesgo de cálculos renales. Sin embargo, en un gran estudio prospectivo, el riesgo de desarrollar cálculos renales en mujeres que toman suplementos de calcio fue 20% mayor que en aquellos que no tomaron los suplementos (Curhan, 1993).

1.7 Hierro

La deficiencia de hierro (Fe) continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública, aún en países desarrollados. Durante los primeros años de vida, esta deficiencia nutricional afecta el desarrollo cognitivo de los individuos en la edad adulta y disminuye la capacidad productiva (Darnton, 2005); además, en las mujeres embarazadas, se ha asociado la deficiencia del mineral con el riesgo de tener niños con bajo peso al nacer y de muerte materna durante el parto, tomando en cuenta que el 40% de las mujeres en los países en vías de desarrollo sufre de anemia ferropénica (Darnton, 1998).

Estos problemas afectan directamente la situación socioeconómica de los países en vías de desarrollo. Por este motivo, los esfuerzos destinados a mejorar el estado de nutrición en Latinoamérica son una de las prioridades de trabajo en materia de salud pública.

El cuerpo humano contiene alrededor de 3.8-4 g de hierro; dependiendo del peso y sexo del individuo. El elemento se encuentra como hierro funcional, hierro de reserva o hierro de transporte (Robinson, 1991).

El hierro funcional abarca aproximadamente dos tercios del hierro total en el organismo, este corresponde al hierro que se encuentra realizando una función metabólica. Gran parte del hierro funcional esta en forma de proteínas hemo (hierro hemo) que se caracteriza por su facilidad en aceptar y liberar oxígeno y electrones, y gracias a estas propiedades puede tener numerosas funciones.

El hierro funcional también puede encontrarse como proteínas no hemo (hierro no hemo), formando parte de determinadas enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo (Soriano, 2006).

El hierro almacenado se encuentra en el hígado, bazo y mucosa intestinal y está en dos formas principales, la ferritina y la hemosiderina que almacenan hasta un 30% del contenido de hierro en los varones, mientras que en la mujer estos

depósitos representan la octava parte del total. La ferritina es la forma básica de almacenamiento, mientras que la hemosiderina resulta de la agregación de restos de ferritina parcialmente degradada, originada cuando la concentración del elemento en la ferritina es alta (Kathleen, 2001).

Por último, el hierro de transporte se encuentra unido a la transferrina en forma férrica (Fe^{3+}). La transferrina se encarga del transporte del elemento desde el enterocito a los tejidos periféricos. Este tipo de hierro se encuentra entre 0.1-0.2% del hierro corporal total (Kathleen, 2001).

1.7.1 Funciones

Las funciones del hierro resultan de sus propiedades físicas y químicas, principalmente de su capacidad para participar en reacciones de oxidación y reducción mediante la transformación en las principales formas de oxidación en que se puede encontrar el elemento: hierro ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). Entre las funciones que tiene el hierro en el cuerpo humano destacan las siguientes:

- ❖ El hierro participa en el transporte respiratorio de oxígeno y dióxido de carbono y en parte activa de enzimas que actúan en el proceso de la respiración celular.
- ❖ La hemoglobina está presente en los glóbulos rojos. El grupo hemo que forma parte de la proteína hemoglobina, contiene hierro, y en función del estado de oxidación de este elemento, se combinará o no con el oxígeno procedente de los pulmones.
- ❖ La mioglobina es una proteína presente en el músculo esquelético y cardíaco, ésta capta el oxígeno que aporta la hemoglobina y sirve de reservorio de oxígeno dentro del músculo. El grupo prostético de esta proteína, al igual que en la hemoglobina, es el grupo hemo.

- ❖ La producción de ATP dentro de la mitocondria utiliza muchas enzimas que contienen hierro. Los citocromos, presentes en las células, actúan en la cadena respiratoria transfiriendo electrones y energía (ATP), al alternar la oxidación y reducción del hierro.

La ingesta adecuada de hierro es esencial para el normal funcionamiento del sistema inmunológico. De hecho, las concentraciones de linfocitos T circulantes se reducen en personas con déficit de hierro.

Dos proteínas que se unen al hierro, la transferrina y lactoferrina, parecen proteger frente a infecciones al evitar que este elemento se una a los microorganismos, los cuáles lo necesitan para su proliferación.

El hierro es necesario para la función cerebral normal en todas las edades, ya que participan en la función y síntesis de algunos neurotransmisores y de la mielina. Así, se han observado diferencias en el rendimiento escolar, la atención, el aprendizaje y la capacidad para la memorización entre niños con anemia y niños con niveles normales de hierro (Soriano, 2006).

1.7.2 Absorción y excreción

El hierro de la dieta puede considerarse de dos tipos, uno de hierro hemo y otro de hierro no hemo. El hemo, está presente en la hemoglobina y la mioglobina de los alimentos de origen animal contribuyendo en un 5 -10% o incluso en un 10-15% al total de hierro ingerido (Lawson *et al.*, 1998). El hierro hemo tiene una elevada disponibilidad (20 al 30%). El hierro no hemo constituye el 60% del hierro en los alimentos de origen animal; además está presente en alimentos de origen vegetal y constituye el principal aporte alimentario de hierro; en los países en desarrollo es con frecuencia, la única fuente (FAO/OMS, 1991).

El hierro puede ser absorbido a lo largo de todo el intestino, pero su absorción es más eficiente en el duodeno y la parte alta del yeyuno (Muir y Hopfer, 1985).

El hierro de la dieta se presenta mayormente en forma férrica que es poco absorbible debido a su insolubilidad al pH intestinal (Raja et al. 1987), por lo que es necesaria su reducción a forma ferrosa. El ácido clorhídrico del estómago, junto con la pepsina, favorece la solubilización del mismo por su reducción a estado ferroso. Por lo anterior, factores que disminuyen la acidez del estómago pueden reducir la absorción de este mineral (Gavin *et al.*, 1994).

La absorción del hierro hemo y no hemo a través de los enterocitos sigue diferentes caminos. El hierro no hemo es captado por dos mecanismos: difusión a través de las células de la mucosa o utilizando un mecanismo activo mediante transportadores dependientes de energía (Beard y Dawson, 1997). Un agente reductor (ascorbato), reduce al hierro no hemo férrico a hierro ferroso en el lumen o el hierro forma quelatos solubles con compuestos lumbinales. El ión es entonces transferido a una proteína lo que permite su unión específica a un transportador de hierro al interior de la célula. Una vez en el interior el hierro es transferido a proteínas semejantes a la transferrina, que lo ceden a la ferritina por lo que queda así en el enterocito.

La absorción del hierro hemo tiene lugar como estructura porfirínica intacta, a través de receptores específicos presentes en la mucosa del borde en el cepillo y se encuentra poco influenciado por los factores lumbinales, ya que en esta forma química no puede ser quelado por los diferentes ligandos, lo que justifica su mayor absorción respecto al hierro no hemo (soriano, 2006).

Una vez captado el hierro hemo, la estructura porfirínica es degradada mediante una homooxigenasa, y se genera bilirrubina que pasa a la circulación portal, por lo que queda el hierro en forma inorgánica formando parte del total de hierro enterocitario común. Cuando el hierro ya se encuentra en la sangre, se produce una distribución y posterior almacenamiento del mismo en órganos como el hígado, el bazo y en la médula ósea para la síntesis de hemoglobina y a todas las células para la síntesis de enzimas que requieren hierro (Rodak. 2004).

La excreción de hierro se realiza fundamentalmente mediante la descamación de enterocitos con un alto contenido de ferritina a la luz intestinal y en cantidades muy pequeñas, a través de la excreción fecal, el sudor y la exfoliación normal del pelo y la piel, además de que en la mujer premenipáusica hay que tener muy en cuenta las pérdidas menstruales. La mayor parte del hierro que se pierde en las heces está formado por el que no puede ser absorbido del consumo de la dieta. Casi no se excreta hierro por la orina (Lorenzo, 2004).

1.7.3 Factores que afectan la absorción de hierro

La absorción del hierro es regulada por diversos factores entre los que se incluyen la cantidad y tipo de hierro presente en la dieta, el pH ó la acidez gástrica y la presencia de otros factores dietéticos que favorecen ó dificultan la absorción del mineral. Una dieta puede aportar diariamente 0.7, 1.4 ó 2.1 mg de hierro según su baja, intermedia o alta biodisponibilidad.

El hierro hemo y no hemo se absorben por mecanismos distintos, viéndose afectados por diversos factores potenciadores o inhibidores de su absorción. El hierro hemo como estructura porfirínica, está poco influenciado por los factores dietéticos ya que en esta forma química no puede ser quelado por diferentes ligandos (Rodak. 2004).

La biodisponibilidad del hierro hemo puede verse afectada por el tratamiento culinario al que la comida es sometida, ya que se puede presentar una desnaturalización provocada por el calor (García *et al.*, 1996). Tratamientos prolongados de horneado y fritura pueden disminuir esta disponibilidad hasta en un 40% (Martínez *et al.*, 1986). La absorción del hierro no hemo tiene una eficacia de absorción con valores del 1-15% (Hallberg *et al.*, 1997).

La disponibilidad del hierro se ve afectada por diversos factores dietéticos que potencian o inhiben su absorción. Entre los potenciadores de la absorción del Fe destacan los siguientes:

Ácido ascórbico: es el mayor potenciador de la absorción del hierro no hemo, no afectando la absorción del hierro hemo (Teucher *et al.*, 2004). El efecto potenciador se debe a que promueve las condiciones ácidas dentro del estómago, solubilizando al hierro de la dieta, reduce el hierro férrico a ferroso que es fácilmente absorbible, formando quelatos con el hierro a nivel del estómago y mantiene la solubilidad del hierro no hemo cuando entra en el ambiente alcalino del intestino delgado (Davison *et al.*, 1998). Los tratamientos térmicos prolongados conducen a la oxidación del ácido ascórbico y por consiguiente a deteriorar su efecto sobre la disponibilidad del hierro (Bothwell *et al.*, 1989).

Vitamina A y β -caroteno: pueden potenciar la absorción del hierro no hemo Layrisse *et al.*, (1997) afirman que el efecto potenciador de la vitamina A sobre la absorción del hierro es debido a una interacción fisicoquímica entre el mineral y la vitamina, resultando un complejo donde el hierro es disponible para su absorción. Otros estudios siguieron que la deficiencia de vitamina A disminuye la síntesis de transferrina, lo que debilita la movilización del elemento desde los almacenes de ferritina (Mejia y Arroyave, 1982).

Proteínas animales: la carne de res, cerdo, ternera, borrego, hígado, pescado, y pollo intensifican la absorción, además de ser una fuente excelente de hierro hemo disponible, aumentan tanto la absorción del hierro hemo como la del no hemo (Heath y Fairweather, 2002). El llamado “factor carne” parece ser debido a que los péptidos liberados durante la digestión de las proteínas forman complejos con el hierro dentro del lumen intestinal, aumentando su solubilidad (Baech *et al.*, 2003). Los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos como la cisteína producto de la digestión de las proteínas animales reducen el hierro de estado férrico a ferroso, facilitando por tanto su absorción (Mulvihill *et al.*, 1998). El contenido de grupos sulfhidrilos disminuye a altas temperaturas debido a su oxidación, por lo que, puede decirse que el “factor carne” disminuirá a altas temperaturas de cocinado. Entre los factores inhibidores destacan:

Fitatos: se ha encontrado una correlación negativa entre el ácido fítico y la absorción del hierro no hemo, debido a la formación de quelatos insolubles (Vitali *et al.*, 2007). Este efecto puede ser evitado por el consumo de pequeñas cantidades de carne y vitamina C, que impiden la formación de dichos quelatos, así como por procesos de degradación del ácido fítico (Davinsson *et al.*, 2001).

Polifenoles: estos compuestos, fundamentalmente los taninos presentes en el té, café y algunos vegetales, se unen al hierro para formar complejos insolubles que son pobremente absorbibles (Samman *et al.*, 2001). La absorción del hierro puede reducirse hasta en un 60% si se acompaña de una taza de té (Hallberg y Rossander, 1982); también se ha encontrado que al consumir vino blanco la absorción de hierro es de 2 a 3 veces mayor que con el vino tinto, lo cual es debido a la alta cantidad de polifenoles que contiene este último (Cook *et al.*, 1995).

Interacción con otros minerales: algunos iones metálicos pueden afectar la absorción del hierro debido a la similitud en sus propiedades fisicoquímicas, compitiendo por el mismo sistema de transporte celular. Se ha encontrado que el zinc puede competir con el hierro debido a un probable transportador en común (Peres *et al.*, 1999); por tanto, el zinc puede tener un efecto negativo sobre la absorción de hierro.

El calcio también disminuye la absorción de ambos tipos de hierro (Gleerup *et al.*, 1993). El efecto inhibitorio depende de la dosis, de tal forma que ingestas inferiores a 40 mg de calcio no producen inhibición en la absorción de hierro, mientras que el máximo efecto se alcanza con ingestas cálcicas de 300 mg (Halberg, 1998). De forma similar, altas dosis de magnesio (Rossander-Hulthen, 1991) y cobre pueden disminuir la absorción intestinal.

1.7.4 Requerimientos y fuentes

Diariamente, un adulto sano pierde ~0,025% de su hierro total (equivalente a 1 mg), el cual debe ser reemplazado por la dieta (Conrad, 2002); estas pérdidas son producidas por la descamación de las células epidérmicas y epiteliales del tracto gastrointestinal y por el microsangrado fisiológico intestinal.

La recomendación para el hierro según el Instituto Nacional de Nutrición es de 10 mg para varones y mujeres posmenopáusicas, 15 mg para las mujeres en edad reproductiva, esto para reponer las pérdidas por la menstruación. En los niños la recomendación es de 10-15 mg y para mujeres embarazadas la IDR aumenta hasta 30 mg.

El hierro se encuentra en distintos tipos de alimentos, tanto animales, como vegetales, destacando las carnes en especial el hígado y derivados, le siguen las legumbres, frutos secos y determinadas verduras, aunque con menor disponibilidad. En la tabla 8, se muestran algunos alimentos y su contenido de hierro.

1.7.5 Deficiencia

La principal causa de la deficiencia nutricional de hierro y de anemia ferropénica, es una incorporación insuficiente del hierro al organismo de acuerdo a los requerimientos fisiológicos del mismo, ya sea por una ingesta insuficiente, una absorción deficiente o un exceso en las pérdidas fisiológicas causadas por hemorragias (Rose *et al.*, 1995). La deficiencia de hierro se da sobre todo en países en vías de desarrollo, donde los niveles de deficiencia de hierro son elevados debido a su dieta basada principalmente en alimentos vegetales y cereales.

Tabla 8. Contenido de hierro de algunos alimentos

ALIMENTO	mg
Cereal, listo para consumir, fortificado, 1 taza	11.16
Almejas, enlatadas, ¼ taza	11.2
Higado de res, frito, 85 g	5.3
Frijoles horneados, 1 taza	5.0
Melazas, sin refinar, 1 cucharada	5.0
Ostiones, cocinados, 28 g	3.8
Papa, horneada, con cascara 1	2.8
Arroz blanco, enriquecido, 1 taza	2.3
Espagueti con salsa de tomate, 1 taza	2.3
Carne, molida de res, 85 g	1.8
Chabacanos, mitades secas, 10	1.7
Harina de avena, no fortificada, 1 taza	1.6
Espinaca, fresca, 1 taza	1.5
Chicharos, congelados, cocinados, ½ taza	1.3
Pan, de trigo entero, 1 rebanada	1.2
Pollo, pechuga, asada, 1	0.9
Chuleta de cerdo, asada, 1	0.7
Brócoli, fresco, cocinado, ½ taza	0.7
Huevo, 1	0.7
Queso, cheddar, 28 g	0.2
Leche, 2% de grasa, 1 taza	0.1

Reproducido de United States of Department of Agriculture (USDA). Composition of Foods. USDA Handbook No. 8 Series. Washington, DC: ARS, USDA, (1976-1986) citado por (Kathleen, 2001)

Las principales alteraciones relacionadas con la deficiencia de hierro son las siguientes:

- ❖ Disminuye la capacidad de realizar una actividad física: la relación entre el estado del hierro y la capacidad de realizar una actividad física determinada

fue estudiada en modelos animales y en seres humanos, donde los resultados experimentales demuestran que la deficiencia de hierro provoca modificaciones significativas en el metabolismo muscular, produciendo una disminución de la capacidad de desarrollar un ejercicio o trabajo prolongado (Brooks, 1997).

- ❖ Disminuye el desarrollo mental y locomotor, ya que el hierro interviene en diversas funciones neurofisiológicas y bioquímicas en el sistema nervioso, como la producción y mantenimiento de la mielina, además de formar parte de muchas enzimas relacionadas con la síntesis de diversos neurotransmisores (Wauben y Waiwright, 1999).

- ❖ Incapacidad de mantener la temperatura corporal: la deficiencia de hierro puede alterar la capacidad de mantener la temperatura corporal en ambientes fríos, relacionada con una disminución de la secreción de la hormona estimulante de la tiroides (Beard *et al.*, 1984).

1.7.6 Toxicidad

Una intoxicación por hierro se puede presentar en personas a las cuales se les administra altas dosis de hierro, ya sea vía oral o parenteral. Los efectos adversos dependen de la dosis y pueden consistir en náuseas, dolor cólico abdominal y diarrea. El hierro por vía parenteral puede provocar reacciones anafilactoides.

La toxicidad aguda por hierro surge tras la ingestión de cantidades elevadas de sales de hierro y suele producirse en niños pequeños que ingieren comprimidos de hierro por descuido de los padres (Rang y Dale, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

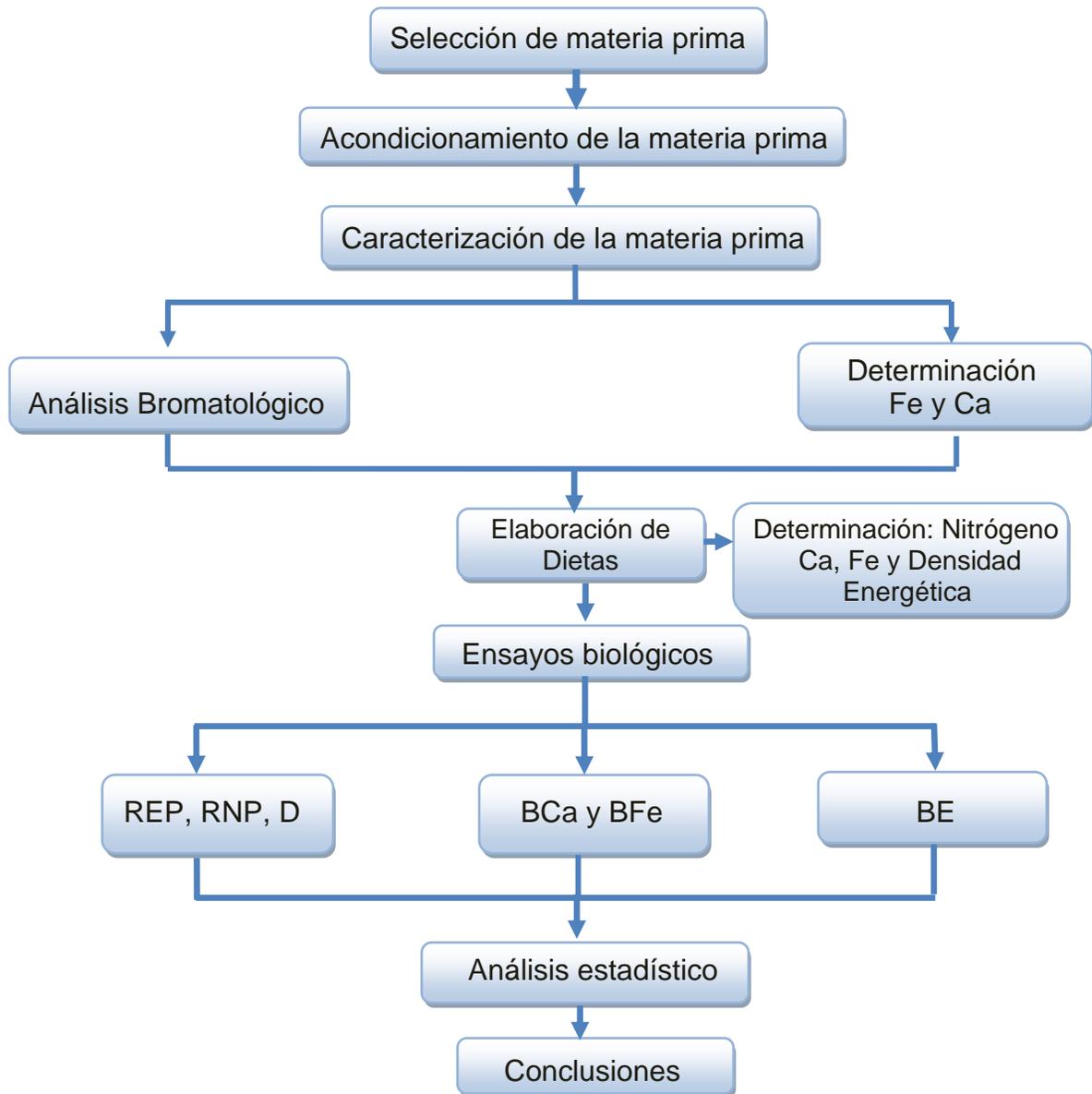
- ❖ Evaluar la calidad proteínica del garbanzo *Cicer arietinum L.* y la biodisponibilidad de hierro, calcio y energía mediante métodos biológicos y químicos, con la finalidad de elaborar una base de datos con fines didácticos para la asignatura, Laboratorio nutricional de alimentos de la carrera de química de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Conocer la composición química del garbanzo *Cicer arietinum L.*, por medio de un análisis bromatológico.
- ❖ Evaluar la calidad de la proteína del garbanzo mediante dos ensayos biológicos Relación de la Eficiencia Proteínica (REP) y Relación Neta de la Proteína (RNP).
- ❖ Determinar la Digestibilidad de la proteína del garbanzo *Cicer arietinum L.* mediante un método *in vivo*.
- ❖ Determinar la biodisponibilidad del fumarato ferroso y citrato de calcio utilizando como vehículo al garbanzo, mediante el balance de estos nutrimentos en un ensayo biológico.
- ❖ Realizar un balance de energía en los animales empleados en el ensayo biológico, mediante la determinación de la densidad energética tanto en el alimento como en las heces.

3. METODOLOGÍA

Figura 3. Diagrama general de la investigación



PER: Relación de la Eficiencia proteínica.

NPR: Relación Neta de la Proteína.

D: Digestibilidad

BFe: Balance de Hierro.

BCa: Balance de Calcio

BE: Balance de energía

3.1 Selección de la materia prima.

Se adquirió garbanzo blanco (*Cicer arietinum*, L.), variedad Kabuli de la marca comercial Verde Valle ®.

3.2 Acondicionamiento de la materia prima.

El grano de garbanzo se limpió de impurezas y se molió en un molino Foss Tecator Mod 1093. La harina obtenida se pasó por una criba (malla no. 20) y se almacenó en recipientes de plástico etiquetados a temperatura de refrigeración.

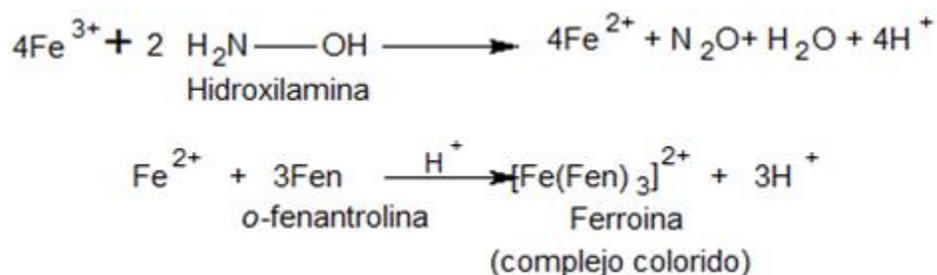
3.3 Caracterización de la materia prima.

Se realizó el análisis bromatológico según los métodos propuestos por la A.O.A.C 2005 que consistieron en la determinación de humedad secado en estufa (método 950.01), cenizas por calcinación (método 923.03), grasa cruda, extracción por Goldfish (método 920.85), proteína cruda por micro kjeldahl (método 960.52A), fibra cruda por digestión ácida y alcalina (método 920.86) e hidratos de carbono por diferencia; además se determinó el contenido de hierro por el método colorimétrico con O-fenantrolina (método 944.02) y calcio por el método de titulación con permanganato de potasio (método 944.03).

3.3.1 Método de cuantificación de hierro

Fundamento

El hierro presente en los alimentos forma parte de las cenizas obtenidas después de la calcinación del alimento. Se redisuelve con HCl y se reduce de Fe^{3+} a Fe^{2+} con ayuda del clorhidrato de hidroxilamina. La forma reducida genera un compuesto de color rojo con la o-fenantrolina, estable a pH de 4 que absorbe a 530 nm (Sierra, 2007).



Material

- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Embudo de tallo corto
- Pinzas para crisol

Equipo

- Parrilla de calentamiento (LABCONCO Mod. 61354)
- Mufla (Thermolyne , Type 1500 furnace)
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific Geneys 10 Uv)

Reactivos

- Solución de clorhidrato de hidroxilamina
- Solución buffer de acetatos, pH 4
- Solución de *o*-fenantrolina
- Solución estándar de hierro (0.01 mg/mL)

Preparación de reactivos

I) Solución de clorhidrato de hidroxilamina: disolver 10 g de la sal en agua destilada y llevar a un volumen de 100 mL.

II) Solución buffer de acetatos, pH 4: disolver 8.3 g de acetato de sodio anhidro y adicionar 12 mL de ácido acético concentrado. Aforar a 100 mL con agua destilada.

III) Solución de *o*-fenantrolina: disolver 0.1 g en 80 mL de agua destilada a 80°C, enfriar y aforar a 100 mL con agua destilada.

IV) Solución estándar de hierro (0.01 mg/mL): disolver 3.512 g de sulfato de hierro y amonio $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$; P.M. 392.14 g] en agua destilada adicionando previamente unas gotas de HCl y aforar a 500 mL. Se toman 10 mL de dicha solución y se llevan a 1L con agua destilada.

Procedimiento

Se pesó 3.5 g de muestra molida en un crisol (a peso constante) para obtener las cenizas. Para ello, primero se calcinó la muestra con mechero bajo una campana de extracción y posteriormente, se colocó en una mufla a 550°C hasta obtener un peso constante y el color de las cenizas homogéneo.

Se dejó enfriar el crisol y se agregaron 2 mL de HCl concentrado para disolver las cenizas, después se calentó en una parrilla hasta sequedad en la campana de extracción y se dejó enfriar. Se adicionó 1 mL de HCl concentrado y 3.5 mL de agua destilada para tratar de disolver las cenizas en su totalidad.

Se pasó cuantitativamente el líquido a un matraz aforado de 50 mL, se lavó el crisol con agua destilada dos o tres veces, transfiriendo los líquidos de lavado al matraz. Finalmente se filtró y aforó.

Del filtrado se tomaron dos alícuotas de 10 mL y se adicionaron los reactivos en el siguiente orden: 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina (solución I) y se agitó; 5 mL de buffer de acetatos (solución II) y 1 mL de *o*-fenantrolina (solución III) y se agitó. Se dejó reposar la mezcla de reacción 15 minutos y posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 530 nm. Si el color desarrollado fue más intenso que el último tubo de la curva estándar, se usaron alícuotas más pequeñas y se completó el volumen a 10 mL hasta que la intensidad del color entrara en el intervalo de la curva estándar. El procedimiento se realizó por triplicado.

Elaboración de la curva estándar.

Se tomaron 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 mL de la solución estándar de hierro, se ajustó cada uno de los tubos a 10 mL con agua destilada y se añadieron los reactivos en el mismo orden que en la muestra problema. Posteriormente se dejó reposar entre 10 y 15 minutos. Al final se midió la absorbancia a 530 nm, empleando un blanco de reactivos (ver anexo 7.1).

Cálculos

Para determinar la cantidad de hierro en la muestra se interpoló la lectura de absorbancia de la muestra en la curva estándar, considerando el aforo, la alícuota utilizada y peso de la muestra.

Para calcular la concentración de hierro en mg/ 100 g de muestra:

$$C = \frac{x \times A \times 100}{p}$$

Donde:

C = mg Fe/100 g muestra

x = concentración de hierro expresada en mg/mL

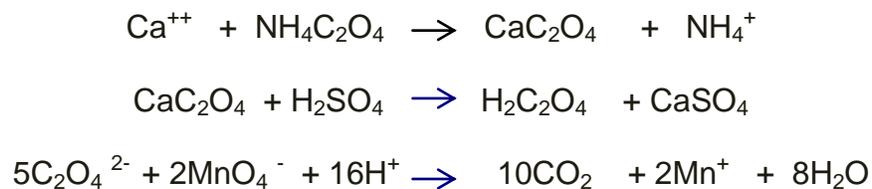
A = Aforo de 50 mL

p = peso de la muestra (g)

3.3.2 Método para cuantificar calcio (Sierra, 2007).

Fundamento.

El ión calcio es precipitado cuantitativamente como oxalato de calcio, mediante la acción del oxalato de amonio. El precipitado de oxalato cálcico es soluble en ácido sulfúrico, pasando a la forma de ácido oxálico y el ácido oxálico se titula con una disolución valorada de permanganato de potasio:



Material

- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Baño María
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Embudo de tallo corto
- Vasos de precipitado de 250 mL
- Pinzas para crisol
- Embudo de vidrio poroso
- Matraz kitasato de 250 mL

Equipo

- Parrilla de calentamiento (LABCONCO Mod. 61354)
- Mufla (Thermolyne , Type 1500 Furnace)

Reactivos

- Solución saturada de oxalato de amonio
- Solución de KMnO_4 0.1 N
- Solución rojo de metilo 0.1 %
- HCl concentrado
- Hidróxido de amonio diluido (1:50)
- H_2SO_4 diluido (0.1 N)

Preparación de reactivos

- Solución saturada de oxalato de amonio. Disolver 100 g en 150 mL de agua destilada.
- Solución de KMnO_4 0.1 N. Pesar 15.6 g de KMnO_4 y aforar a 1L.

- Solución rojo de metilo 0.1 %. Pesar 0.1 gramo y llevar a 100 mL de etanol.

Procedimiento

Se calcinaron 3g de muestra a 550°C hasta obtener cenizas blancas, éstas se humedecieron con 5 mL de HCl concentrado, evaporando a sequedad utilizando una parrilla eléctrica. Al residuo se le adicionó 5 mL de HCl concentrado, calentando hasta inicio de ebullición. Posteriormente se dejó enfriar y se adicionaron 10 mL de agua, esto se filtró recibiendo en un matraz aforado de 50 mL, lavando cuantitativamente el matraz. Finalmente se aforó al volumen (Soln. "A").

Se transfirieron 25 mL de la solución "A" a un vaso de precipitados de 100 mL, adicionando agua hasta tener un volumen de 50 mL. Se calentó a ebullición y se adicionaron 10 mL de solución saturada de oxalato de amonio y tres gotas de indicador rojo de metilo. A continuación se adicionó amoniaco gota a gota hasta llegar al punto de neutralización y se calentó hasta que precipitara el oxalato de calcio. Se dejó enfriar y se adicionó HCl 0.01 N hasta obtener coloración rosa (pH 5) y se dejó reposar toda la noche.

Al día siguiente se filtró el oxalato de calcio utilizando un embudo de vidrio poroso, el matraz kitasato y con ayuda de vacío. Se lavó el oxalato de calcio con 50 mL de hidróxido de amonio diluido (1:50) hasta llegar a 100 mL, desechando el hidróxido de amonio utilizado. Posteriormente, se lavó perfectamente el matraz kitasato y se procedió a la disolución del oxalato de calcio con 100 mL de H₂SO₄ 0.1 N caliente. Finalmente se tituló en caliente con la solución de KMnO₄ 0.1 N hasta que se obtuvo una coloración rosa permanente. El procedimiento se realizó por duplicado.

Cálculos

El porcentaje de calcio en el alimento se calculó utilizando la equivalencia de 1mL de disolución de KMnO_4 0.1N equivale a 2 mg de calcio (AOAC, 2005).

$$\% \text{ Ca} = \frac{(\text{Vol KMnO}_4)(0.002 \text{ g Ca})(\text{Aforo})}{(1 \text{ mL KMnO}_4 \text{ 0.1N})(\text{Alícuota})(M)} \times 100$$

Donde:

Vol KMn_4 : Volumen gastado de KMnO_4 0.1N

Aforo: Aforo utilizado (mL)

Alícuota: alícuota utilizada (mL)

M: peso de la muestra (g)

3.4 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP)

Fundamento

Se basa en el grado de crecimiento de un animal bajo condiciones bien definidas, y provee la información para evaluar la calidad nutritiva de una proteína, ya que si ésta tiene una deficiencia en uno o más aminoácido indispensables, o estos no están biodisponibles para ser absorbidos, el crecimiento del animal se verá reducido al compararse con una proteína de referencia utilizada al mismo tiempo que la que está en prueba.

Para que este método tenga reproducibilidad es necesario que la dieta de prueba contenga la misma concentración de proteína que la dieta de referencia, y su aporte se debe ajustar a las necesidades mínimas del organismo y a la eficiencia en su utilización para garantizar que se aprovechará en su totalidad, confirmándose experimentalmente que un nivel de 10% de proteína es el aconsejable; es decir, que la dieta sea isoproteínica e isoenergética a la dieta de referencia, además de llevar los otros micronutrientes requeridos como

vitaminas y minerales. Con esto la única variable será la calidad de la proteína del alimento en estudio. (Adrian, 2000).

Material

- Dieta de referencia (Caseína)
- Dietas a evaluar (isoproteínica e isoenergética con respecto a la dieta de referencia)
- Jaulas individuales de acero inoxidable
- Comederos y bebederos
- Balanza granataria para pesar animales de laboratorio
- Balanza granataria
- Papel manila
- Cernidor (de 2 ± 0.5 mm de abertura)
- Franela o un trapo limpio

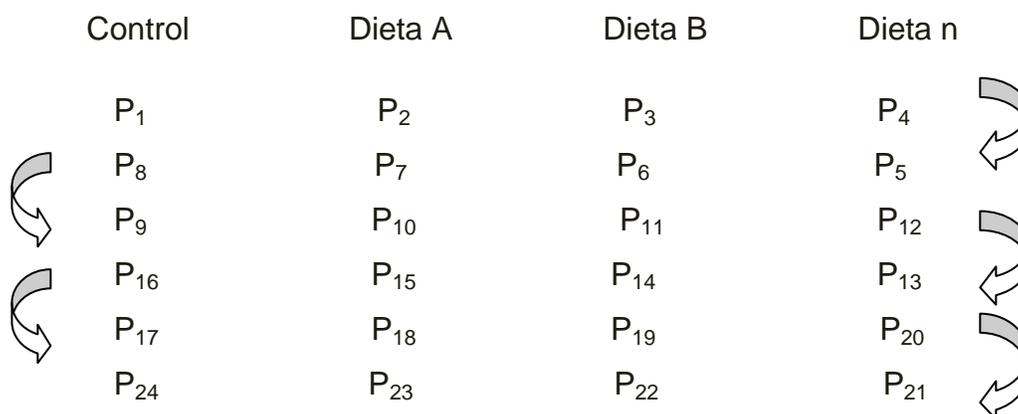
Procedimiento. (Técnica descrita por la AOAC 960.48 -2005)

Para los bioensayos se emplearon ratas macho Wistar, recién destetadas de 21 a 23 días.

El periodo de ensayo duró 28 días y se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*, en condiciones de 12 horas de iluminación por 12 horas de oscuridad a una temperatura de 23 a 24°C y una humedad relativa entre 30 a 35 %.

El número de ratas para cada lote de dieta en estudio fue de 6. Todos los animales se pesaron y ordenaron de forma ascendente con respecto a su peso.

Se colocaron los animales en las jaulas individuales del rack siguiendo la distribución de “culebra japonesa” como se indica a continuación:



Una vez distribuidos los animales en las jaulas individuales, se les colocó el comedero con la dieta correspondiente en exceso para que su consumo fuera *ad libitum*, de igual manera se controló el agua del bebedero. Las ratas al alimentarse tienden a desperdiciar alimento por lo que se colocó debajo de cada jaula una charola hecha con papel manila, para recuperar y poder calcular el alimento realmente ingerido. Los animales se pesaron los días lunes, miércoles y viernes. Se registró el peso de cada rata y el alimento real ingerido. En el anexo 7.3 se muestran las tablas con el vaciado de datos durante los 28 días que duró el experimento.

Cálculos

Al final del experimento, se procedió a calcular la REP de cada uno de los animales, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$REP = \frac{\Delta P}{\sum AI \times F}$$

Donde:

ΔP = Incremento de peso (expresado en gramos)

$\sum AI$ = Alimento ingerido acumulado o total (expresado en gramos)

F = Factor de conversión unitario de alimento a proteína (% de proteína en la dieta / 100)

Con cada uno de los valores individuales de la REP, se procedió a calcular la REP promedio del lote en estudio.

Ya que los métodos biológicos presentan con mucha frecuencia variación interlaboratorio, se sugiere expresar el valor de REP en términos de Relación de Eficiencia Proteínica ajustada o corregida (REP_a); para lo cual, es necesario contar con el valor experimental de este índice biológico del lote de animales alimentados con la dieta de caseína (referencia) que cumplan los requisitos mínimos de experimentación. Se le ha asignado un valor estandarizado de REP de 2.5 a la proteína de referencia; por tal motivo, es conveniente informar el resultado en términos de REP_a .

$$REP_a = REP (PRUEBA) \frac{REP (CASEÍNA)_{STD}}{REP (CASEÍNA)_{EXP}}$$

Donde:

REP (PRUEBA) = REP experimental de la proteína a evaluar

REP (CASEÍNA)_{STD} = REP de caseína estandarizado = 2.5

REP (CASEÍNA)_{EXP} = REP de caseína obtenido en el experimento

3.5 Determinación de la relación de proteína neta (RPN)

Fundamento

Determina la cantidad de peso corporal que se perdería si el animal de experimentación no ingiriera proteína durante el periodo de ensayo, ya que antes de que se genere el incremento de peso corporal, la proteína por ensayar debe cubrir las necesidades proteínicas de mantenimiento y elimina casi por completo

el efecto no deseable que producen proteínas de baja calidad al realizar el método de la REP.

Procedimiento

Debido a que el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química no permite utilizar un lote de ratas alimentadas con una dieta libre de nitrógeno (DLN), para evitar el estrés en los animales, no se incluyó la DLN en el ensayo por lo que se consideró la ecuación propuesta por Venegas (2011) para predecir el decremento de peso del animal si éste hubiera consumido una DLN utilizando el promedio de peso inicial de las ratas de cada lote.

Cálculos

Se calculó el decremento de peso con la ecuación que predice el Δ de peso, si los animales hubieran ingerido la dieta libre de nitrógeno propuesta por Venegas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta p (\text{DLN}) = - 0.114(\bar{x}) - 1.461$$

Donde:

$\Delta p (\text{DLN})$ = decremento de peso del animal, si hubieran consumido una DLN

\bar{x} = peso inicial promedio de cada lote.

Este cálculo se realizó para cada lote de dietas evaluadas, el valor promedio obtenido (-6.55) fue el que se utilizó para calcular los valores de RPN.

Una vez calculado el Δp de cada lote se calculó el valor de RPN para cada rata con la siguiente fórmula.

$$\text{RPN} = \frac{[\Delta P(\text{PRUEBA}) - \Delta P(\text{DLN})]}{\sum AI \times F}$$

Donde:

ΔP (PRUEBA) = Incremento de peso con la dieta de prueba (g)

ΔP (DLN) = Decremento de peso con la DLN (g)

ΣAI = Alimento ingerido en el periodo de 10 días (g)

F = Factor de conversión de alimento a proteína (% de proteína en la dieta /100)

Se puede calcular la RPN ajustada (RPN_a), ya que se le ha asignado un valor estandarizado de RPN de 4.1 a la proteína de referencia; por tal motivo, es conveniente reportar el resultado en términos de RPN_a , para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$RPN_a = RPN \text{ (PRUEBA)} \frac{RPN \text{ (CASEÍNA)}_{STD}}{RPN \text{ (CASEÍNA)}_{EXP}}$$

Donde:

RPN (PRUEBA) = RPN experimental de la proteína a evaluar.

RPN (CASEÍNA)_{STD} = RPN de caseína estandarizado = 4.1

RPN (CASEÍNA)_{EXP} = RPN de caseína experimental.

3.6 Determinación de la digestibilidad aparente de una proteína mediante un método *in vivo*.

Fundamento

Cualquier método para evaluar la calidad nutritiva de una proteína de la dieta, debe estimar directa o indirectamente la biodisponibilidad de los aminoácidos para la biosíntesis de nuevas proteínas. La digestibilidad es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento, y es definida como “la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo

de prueba” para lo cual se determina la cantidad de nitrógeno ingerido en la dieta y el excretado en heces para conocer el nitrógeno absorbido (Adrian, 2000).

Material

- Frascos de vidrio de boca ancha con tapa de aproximadamente 200 mL
- Cernidor con malla de 8 ó equivalente
- Mortero con pistilo
- Tubo micro-Kjeldahl para digestión

Equipo

- Estufa (Lab-Line Instrument Inc. Mod 29380)
- Balanza analítica (Sartorius Analytic Mod. A210P)
- Equipo de digestión para micro-Kjeldahl (Marca Buchi)
- Equipo de destilación para micro-Kjeldahl (Marca Buchi)

Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado.
- Sulfato de sodio o potasio.
- Sulfato de cobre pentahidratado.
- Ácido o-fosfórico.
- Fenolftaleína.
- Etanol .
- Verde de bromocresol .
- Rojo de metilo R.A.
- Agua oxigenada al 30%
- Ácido bórico .
- Hidróxido de sodio .
- Ácido clorhídrico 0.01N (valorado)

Preparación de reactivos

I) Mezcla digestiva: disolver 3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 20 mL de agua destilada; a continuación agregar 50 mL de ácido o-fosfórico y una vez que esté bien disuelta la sal, adicionar con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla se deja agitando por aproximadamente 30 minutos.

II) Solución indicadora A: pesar 100 mg de fenolftaleína y disolver con etanol. Aforar a 100 mL con etanol.

III) Solución indicadora B: pesar 33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo, los cuales se disuelven y aforan a 100 mL de alcohol etílico.

IV) Solución de ácido bórico al 0.5% con indicadores: disolver 5 g de ácido bórico en 800mL de agua destilada, adicionar 35 mL de la solución II y 10 mL de la solución III. Mezclar y adicionar suficiente agua hasta dejar un espacio de 2 cm en el cuello del matraz aforado, ajustar el color de esta solución con ácido o base a un tono café rojizo y por último aforar a 1 litro con agua destilada.

V) Solución de hidróxido de sodio al 36%: disolver 36 g de NaOH en 75 mL de agua destilada y llevar a un volumen final de 100 mL.

VI) Ácido clorhídrico 0.01 N: esta solución debe estar exactamente valorada hasta la cuarta cifra decimal.

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC 991.29- 2005)

Se trabajó empleando las mismas ratas del bioensayo REP. A partir de la última semana del ensayo biológico se recolectaron las heces de los animales, y para disminuir el número de análisis se juntaron las heces de tres ratas obteniendo dos muestras por cada lote de dieta a evaluar. Las heces del periodo indicado, se colocaron en un recipiente de vidrio y se secaron en una estufa, para contar con el

peso total de este material biológico y se molieron con ayuda de un mortero para obtener el material lo más homogéneo posible.

Con las heces homogéneas, se tomó una muestra representativa del total para determinarles la concentración de nitrógeno por el método de Kjeldahl.

Para calcular la digestibilidad, se requirió conocer el contenido de nitrógeno de las heces (NF), pero además, fue necesario contar con el nitrógeno ingerido (NI) durante el mismo periodo (una semana). Los datos anteriores se obtuvieron conociendo la concentración de proteína de la dieta por el método kjeldahl y la cantidad consumida de dieta en dicho periodo.

Cálculos

Una vez que se determinó la concentración de nitrógeno de las dietas y de los pool de heces de cada lote, se calculó el contenido de nitrógeno ingerido (NI) y el nitrógeno fecal (NF) de cada pool de ratas de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$NI = (\%N_{DIETA} \times \text{Dieta ingerida})/100$$

$$NF = (\%N_{HECES} \times \text{Total de heces por pool})/100$$

Para calcular la digestibilidad *in vivo* se hace uso de la siguiente fórmula:

$$Da = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

Estrictamente, la fórmula anterior corresponde a la digestibilidad aparente (D_a), la cual generalmente se expresa en términos de porcentaje.

3.7 Elaboración de dietas.

Se elaboraron 6 dietas isoproteínicas (10%) e isoenergéticas (18 kJ/g): caseína, caseína adicionada con citrato de calcio (CCa), caseína adicionada con Fumarato ferroso (FFe), garbanzo, garbanzo adicionada con citrato de calcio y garbanzo adicionada con fumarato ferroso. Las dietas se elaboraron utilizando una dieta de

caseína como referencia (ver anexo 7.4). La cantidad de hierro adicionada fue de 0.04% y 0.15% de calcio.

Material requerido para la preparación de la dieta.

- Balanza granataria
- Recipientes para pesar
- Mezcladora Oster®
- Caseína* (MP Biomedicals inc., 901293)
- Sacarosa (comercial Salwill®)
- Glucosa* (USP Comercial Químico BARSA)
- Dextrina (Maizena®)
- Aceite de maíz (Mazola®)
- Manteca vegetal (INCA®)
- Mezcla de vitaminas* (MP Biomedicals inc., 904654)
- Mezcla de minerales* (MP Biomedical inc., 902842)
- Celulosa* (SIGMA C-8002)
- Colina (solución al 50%)
- Fumarato ferroso (Ferval ®. 1 tableta/200 mg Fe elemental)
- Citrato de calcio (Citracal ®. 1 tableta/ 315 mg Ca elemental)

Se realizaron los cálculos para 100 g de cada dieta, se pesaron los ingredientes y homogeneizaron con ayuda de una mezcladora Oster®. Posteriormente se almacenaron en recipientes de polietileno bajo refrigeración para su posterior análisis químico y biológico. En la tabla 9, se muestran las formulaciones de las 6 dietas elaboradas.

3.7.1 Análisis químico de las dietas.

Una vez elaboradas las dietas se determinó el contenido de proteína por el método Kjeldahl (AOAC método 960.52-2005) contenido de hierro por el método colorimétrico , calcio por titulación con KMnO_4 y densidad energética utilizando

una bomba calorimétrica balística GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L siguiendo los métodos descritos por la A.O.A.C (2005).

Tabla 9. Formulación de las dietas de caseína y garbanzo (g/100g)

Materia prima	Dietas (g/100g)					
	Caseína Referencia	Caseína + CCa	Caseína + FFe	Garbanzo	Garbanzo+ CCa	Garbanzo + FFe
Caseína (85.16%)	10.6	10.6	10.6	-----	-----	-----
Garbanzo	-----	-----	-----	47.98	47.98	47.98
Sacarosa	22	22	22	11.72	11.72	11.72
Glucosa	19	19	19	10.13	10.13	10.13
Dextrina	25	25	25	13.33	13.33	13.33
Aceite de maíz	6	6	6	4.92	4.92	4.92
Manteca vegetal	8	8	8	6.56	6.56	6.56
Mezcla de sales	2	2	2	0.54	0.54	0.54
Vitaminas	1	1	1	1	1	1
Colina (sol.50%)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Celulosa	6	6	6	3.42	3.42	3.42
Fumarato ferroso	----	----	0.04	----	----	0.04
Citrato de calcio	----	0.15	----	----	0.15	----

3.7.2 Densidad energética (método de la bomba calorimétrica balística)

Fundamento

El principio en el cual se basa la determinación del contenido energético en la bomba calorimétrica, es en la primera ley de la Termodinámica, la cual se fundamenta en el siguiente enunciado: “La energía en cualquier proceso físico o químico no se crea ni se destruye”. Con base en el principio anterior, la energía en un sistema se puede transformar; por lo tanto, la energía total será la suma de las energías parciales. En el caso de la bomba calorimétrica, hay una conversión de la

energía química en la producción de energía térmica, la cual se detecta por el cambio en la temperatura (Atkins, 2008).

En la bomba calorimétrica balística que Miller y Payne diseñaron, el principio del sistema consiste en la combustión de la muestra de peso conocido por ignición eléctrica, en una atmósfera de oxígeno. La energía producida en forma de calor, se transmite al cuerpo o cilindro de la bomba, el cual a su vez se conecta a un dispositivo medidor (detector) del cambio de temperatura. Actualmente, las mejoras a la bomba calorimétrica balística consisten en reducción de la capacidad calórica del cuerpo o cilindro y un detector de mayor sensibilidad al cambio de temperatura.

Material

- Desecador de vidrio
- Mecha de algodón de 75 mm de longitud
- Crisol de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro (1 pulgada)
- Mango metálico compactador

Equipo

- Balanza analítica con precisión de 0.1 mg (Sartorius Analytic Mod. A210P)
- Estufa de secado (Lab-Line Instrument Inc. Mod 29380)
- Bomba calorimétrica balística (GALLENKAMP, Mod. CBB-330-010L)

Reactivos

- Ácido benzoico (contenido energético certificado)

Procedimiento

Se pesaron 0.5 g de muestra y se colocó en un crisol de acero inoxidable tarado junto con la mecha de algodón, de tal manera que el hilo quedara dentro de la muestra. Se pesó en una balanza analítica el peso preliminar (Pp), contemplando

un exceso aproximado del 10% del peso deseado. Se compactó la muestra con el mango metálico de tal forma, que quedara lo más uniforme posible y la mecha introducida dentro de la muestra, sobrando un tramo que sirvió para contactar con el alambre de ignición de la bomba. El crisol con la muestra compacta se pesó nuevamente para obtener el peso final (Pf).

El crisol se colocó en la base superior del pilar central de la bomba, se introdujo la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición. Se procedió a realizar la combustión. El cierre se realizó colocando el capuchón de la bomba sobre el anillo metálico y se giró hasta que coincidió la rosca con el del capuchón. En seguida, se colocó el sensor del termopar en el orificio del capuchón.

El suministro de oxígeno a presión (cilindro con mínimo 30 bars) se procedió abrir la válvula de paso girando $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ la perilla obteniendo una presión dentro de la bomba balística de 25 bares (1 bar= 0.987 atm) en aproximadamente 20 a 30 segundos. Una vez que se alcanzó la presión, se cerró la válvula de paso y se ajustó el galvanómetro, primero con la ayuda del ajuste grueso y posteriormente con el dispositivo de ajuste fino. Se oprimió el botón de ignición llevándose a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro, es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.

Una vez que se toma la lectura, se abrió la válvula de salida de los gases de combustión, la cual se localiza en la base de la bomba del lado opuesto a entrada del oxígeno; A la vez, se desconectó el sensor del termopar y una vez liberados los gases de combustión, se procedió abrir la bomba girando el anillo metálico en sentido inverso al cierre. Por último, se cerró la válvula de liberación de gases y se dejó enfriar el capuchón de la bomba en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente, para poder realizar una nueva determinación (Miller y Payne, 2007).

Elaboración de la curva estándar

Para calcular la densidad energética de la muestra, se realizó una curva estándar, para la cual se realizó la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico anotando la respectiva lectura del galvanómetro. Se pesaron entre 0.1 y 0.7 g de ácido benzoico (contenido energético certificado); también se llevó a cabo la combustión exclusiva de la mecha de algodón, para corregir los datos obtenidos. Una vez obtenida la lectura, se convirtió a unidades de energía, con las siguientes conversiones:

$$1 \text{ g de ácido benzoico} = 26\,454.3 \text{ J} = 26.45 \text{ kJ}$$
$$4.1868 \text{ kJ} = 1 \text{ kcal}$$

Cálculos

Una vez obtenida la curva estándar del contenido energético (abcisas) vs lectura del galvanómetro (ordenadas), (ver anexo 7.2) la densidad calórica de las muestras se obtuvo por interpolación. La densidad energética de la muestra se calculó con la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{kJ}}{100} \text{ g de muestra} = \frac{\text{lectura}}{\text{peso de la muestra (g)}} \times 100$$

Donde:

Lectura: Lectura del galvanómetro en unidades de energía (kJ)

3.8 Balance de hierro y calcio

Fundamento

Determinando el contenido de hierro y de calcio tanto en el alimento ingerido como en las heces de los animales, se podrá calcular el balance de estos minerales y así conocer la cantidad de hierro y calcio absorbido por los animales.

Procedimiento

Durante la última semana del ensayo biológico se recolectaron las heces de las ratas juntando las heces de tres ratas para obtener 2 muestras de cada lote.

Se determinó el contenido de hierro y calcio empleando los métodos descritos anteriormente.

Cálculos

$$BCa = CCa_A - CCa_H$$

Donde:

BCa = g de calcio absorbido

CCa_A = g de calcio ingerido

CCa_H = g de calcio en heces

$$BFe = CFe_A - CFe_H$$

Donde:

BFe = mg de hierro absorbido

CFe_A = mg de hierro ingerido

CFe_H = mg de hierro en heces

Para calcular el porcentaje del mineral absorbido se utilizó la siguiente ecuación

$$\% \text{ del mineral absorbido} = \frac{\text{cantidad ingerida} - \text{cantidad en heces}}{\text{cantidad del mineral ingerido}} \times 100$$

3.9 Balance de energía

Fundamento

Determinando la cantidad de energía que ingirieron las ratas a través del alimento y la cantidad que excretaron en heces, conoceremos la cantidad de energía que absorbieron.

Procedimiento

Se determinó la energía gruesa (EG) tanto en las dietas evaluadas como en las heces utilizando el método de la bomba calorimétrica balística anteriormente descrito. Conociendo la energía ingerida por las ratas y la energía en heces, mediante un balance, se obtuvo el valor de la energía digerible (ED) que se refiere a la energía que absorbió el animal.

Cálculos

Para calcular el balance de energía, se utilizaron los datos de alimento ingerido y peso de las heces, así como la energía gruesa determinada tanto de dietas como de heces, para poder determinar el porcentaje de Energía Digerible o absorbida. Para lo anterior se empleó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ ED} = \frac{\text{energía ingerida} - \text{energía heces}}{\text{energía ingerida}} \times 100$$

Donde:

Energía ingerida= alimento ingerido (g) x energía gruesa del alimento (kJ/g)

Energía fecal= heces (g) x energía gruesa de las heces (kJ/g)

También se puede calcular la energía digerible determinando el total de nutrimentos digeribles de la dieta, tomando en cuenta la cantidad de proteína,

carbohidratos digeribles y grasa presente en las dietas utilizando las siguientes formulas.

$$\text{TND} = \text{CPD} + \text{CCHOD} + 2.25 \text{ CEE}$$

Donde:

TND= Total de nutrimentos digeribles

CPD= contenido de proteína digerible expresado en unidades de peso (g/ g dieta).

CCHOD= Contenido de hidratos de carbono digeribles expresado en unidades de peso.

CEE= Contenido de extracto etéreo digerible expresado en unidades de peso.

La Energía Metabolizable (EM) es el resultado de la energía digerible menos la energía urinaria, y es la cantidad de energía retenida por el organismo, representa la cantidad de energía que el animal utiliza para sus diferentes necesidades (Mora, 2007).

Debido a que en este estudio no se recolectó la orina de los animales, la EM se calculó teóricamente con la siguiente ecuación:

$$\text{EM} = [(0.95 - F)\text{EG}] - 31.4 \text{ N}$$

EM= Energía Metabolizable expresada en kJ/g

F= Fibra cruda expresada en unidades de peso (g fibra/ g de dieta)

EG= Energía Gruesa expresada en kJ/g

N= Nitrógeno expresado en unidades de peso (g N/g de dieta)

3.10 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos del REP y RNP calculados para cada rata deben mostrar homogeneidad, para lo cual se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada lote, el cual debe ser menor o igual a 15, en caso contrario se debe reducir el intervalo de los datos presentados, por consiguiente se eliminan los valores extremos, o sea el dato más alto y el más bajo y se recalcula el CV.

Los resultados obtenidos de REP Y RNP fueron analizados utilizando un análisis de varianza en bloques de un factor, con un nivel de significancia de 0.05, seguido de una comparación de medias por el método de la diferencia mínima significativa (DMS) para determinar si existe diferencia significativa entre las dietas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Análisis bromatológico de la harina de garbanzo.

En la tabla 11, se muestran los resultados obtenidos del análisis bromatológico en donde el garbanzo comercial Verde Valle® presentó una humedad del 4.56%, que es un valor adecuado, ya que por cuestiones de almacenamiento la humedad debe ser baja para evitar la contaminación por microorganismos. La Norma del Codex para determinadas legumbres 171-1989, establece un valor máximo de humedad para harinas de garbanzo de 12%.

Tabla 11. Composición química de la harina de garbanzo¹

Parámetro	% Base húmeda	% Base seca	Valores teóricos ⁴ % base seca
Humedad	4.56 ± 0.005	---	---
Proteína cruda²	20.84 ± 0.23	21.84± 0.24	20.10
Grasa cruda	5.25 ± 0.23	5.5± 0.24	6.6
Fibra cruda	2.07± 0.32	2.17± 0.33	4.0
Cenizas	3.05 ± 0.01	3.2± 0.01	3.12
Hidratos de Carbono³	64.23 ± 0.19	67.3± 0.2	66.18
Hierro mg/100g	6.03 ± 0.63	6.31± 0.65	7.0
Calcio mg/100g	80 ± 0.56	83.82± 0.57	100

1. Resultados promedios de triplicados ± desviación estándar 2. F= 6.25 factor de conversión

3. Hidratos de carbono obtenidos por diferencia 4. Fuente: Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran Muñoz (1996)

En cuanto al contenido proteína cruda, grasa cruda, cenizas e hidratos de carbono los valores encontrados fueron similares a los reportados por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zúbiran, excepto en el caso del contenido de calcio, y fibra cruda con una diferencia del 16.18 % y 1.83 respectivamente. La diferencia en el contenido de calcio se puede deber a varios factores como son las

condiciones de cultivo ya que la cantidad de minerales pueden variar tanto en el suelo donde se cultiva la leguminosa como en el agua que se utiliza para su riego. Incluso, pueden influir la contaminación de origen industrial, los tratamientos tecnológicos (molienda) o los materiales que estuvieron en contacto con el producto final (Farré *et al.*, 1985).

En cuanto a la diferencia en el contenido de fibra cruda debido a que el método requiere de mucha manipulación es posible que se haya perdido muestra durante la determinación de ésta.

4.2. Calidad proteínica de la harina de garbanzo.

En la tabla 12, se muestran los valores de REP y RPN ajustados y los valores de digestibilidad aparente de las dietas evaluadas. Se observa que los valores de REP_a y RPN_a respectivamente no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) para las tres dietas de caseína. Lo mismo sucedió en el caso de las dietas a base de garbanzo, en donde no se observó diferencia significativa entre las tres dietas.

Tabla 12. Valores de REP, RPN experimentales¹, ajustados y digestibilidad aparente²

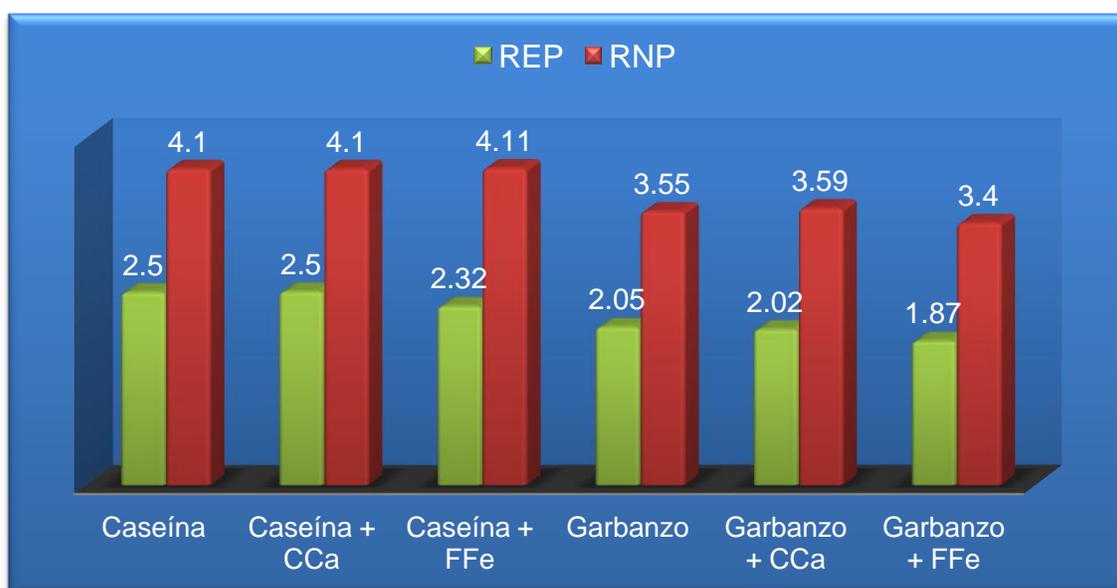
Dieta	REP _a	RPN _a	D _a
Caseína	2.50± 0.31 ^a	4.10± 0.49 ^a	85.47
Caseína + CCa	2.51± 0.36 ^a	4.10 ± 0.58 ^a	79.98
Caseína + FFe	2.32± 0.44 ^a	4.11± 0.41 ^a	89.30
Garbanzo	2.05± 0.17 ^b	3.55± 0.49 ^b	63.17
Garbanzo+ CCa	2.02± 0.23 ^b	3.59± 0.46 ^b	54.70
Garbanzo + FFe	1.87± 0.26 ^b	3.40± 0.43 ^b	71.13

1. Valores promedio de REP y RNP experimentales ± desviación estándar. n=6 2. Digestibilidad se determinó por duplicado con un Pool de 3 ratas . FFe: Fumarato ferroso. CCa: Citato de calcio.

Nota: Letras diferentes en cada columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

Comparando los valores de REP_a Y RPN_a de las dietas a base de caseína contra las de garbanzo, se observaron diferencias significativas, (gráfica 3) esto era de esperarse, debido a que la calidad proteínica de la caseína es mayor por ser de origen animal, ya que contiene todos los aminoácidos indispensables y en mayor cantidad (Alais, 2003), mientras que el garbanzo obtuvo un valor de REP_a de 2.05 y 3.55 para RPN_a, que son similares a los valores reportados por Ulloa 1992 y Cornejo 2010, que son de 2.23 y 3.84, respectivamente.

Gráfica 3. Valores de REP Y RPN ajustados



Se observa diferencia significativa entre dietas elaboradas con diferente fuente de proteína (caseína- garbanzo) pero no entre dietas elaboradas con la misma fuente.

En cuanto a los valores de digestibilidad, para la dietas de caseína se observaron diferencias entre las tres dietas, siendo la dieta de caseína adicionada con fumarato ferroso la que presentó el porcentaje más alto de digestibilidad (89.3%), seguida de la dieta caseína no adicionada (85.47%) y por último la dieta de caseína adicionada con citrato de calcio (79.98%). Estas diferencias se pueden observar en la gráfica 4, donde se muestran todos los valores de digestibilidad.

Las dietas de garbanzo también presentaron diferencias en cuanto a los valores de digestibilidad, encontrando que el porcentaje más alto se presentó en la dieta

de garbanzo adicionada con fumarato ferroso (71.13%), seguida de la dieta de garbanzo (63.17%) y por último, la dieta de garbanzo adicionada con citrato de calcio (54.7%).

Gráfica 4. Valores de digestibilidad aparente



Se observa la disminución de la digestibilidad de la proteína con la adición de CCa y un aumento de esta en las dietas adicionadas con FFe

Los valores encontrados de digestibilidad aparente sugieren que la adición de la sal de hierro mejoró la digestibilidad de la proteína tanto en caseína como en garbanzo incrementándola en aproximadamente un 4 y 8% respectivamente, mientras que con la adición del citrato de calcio la digestibilidad se vio disminuida en un 5 y 8% respectivamente.

A pesar de que la digestibilidad de las proteínas estudiadas se vio afectada por la adición de las sales de hierro y calcio, los valores encontrados de REP Y RPN no mostraron estos cambios; esto se puede deber a que en éstos bioensayos se evalúa a la proteína en base a la ganancia de peso de los animales en estudio y no determina la proteína que éstos absorben, lo que indicaría que existen otros

factores involucrados en el crecimiento de los animales aparte de las proteínas, ya que a pesar de la menor absorción de los aminoácidos en las dietas adicionadas con calcio el incremento de peso fue muy similar a las otras dietas elaboradas con la misma fuente de proteína.

En cuanto a la variación de la digestibilidad en las proteínas debida a la adición de las sales evaluadas, Meehye *et al.* (1995) encontraron que la absorción del hierro está influida por el tipo de proteína presente en el alimento, proponiendo que éste forma complejos solubles de fácil absorción con los aminoácidos, lo que podría explicar que al mismo tiempo ayudara a la absorción de los aminoácidos de la proteína del garbanzo y caseína viéndose aumentada la digestibilidad de estas y en mayor proporción en la dieta de caseína (89.3%). Por el contrario, con la adición de citrato de calcio se vio disminuida la digestibilidad de las proteínas, esto se puede deber a la formación de compuestos insolubles entre los aminoácidos y el calcio.

La digestibilidad de la caseína fue mayor (85.47%), en comparación con la del garbanzo (63.17 %). Attia *et al.* (1994) y Periago *et al.* (1997) reportan una digestibilidad *in vitro* de 72.69% e *in vivo* de 78.9% para garbanzo. Estos valores fueron obtenidos utilizando garbanzo que fue sometido a un proceso térmico previo; mientras que Ahmadzadeh y Prakash (2007) reportaron una digestibilidad *in vitro* del garbanzo crudo de 61 %, que puede ser comparable con el obtenido en este trabajo debido a que el garbanzo utilizado no tuvo tratamiento térmico previo.

La menor digestibilidad de la proteína del garbanzo en comparación con la caseína, se debe principalmente a que el garbanzo por su origen vegetal contiene factores antinutricionales, (pero en menor cantidad que otras leguminosas como el frijol), tales como inhibidores de proteasas y compuestos polifenólicos que pueden disminuir la biodisponibilidad de los aminoácidos de la proteína.

En relación a los inhibidores de tripsina se han reportado valores de 11.9 unidades/mg de proteína en garbanzo (Saleh *et al.*, 2006). Los compuestos polifenólicos pueden inhibir la absorción de la proteína formando complejos con

ésta y se encuentran en una cantidad de 4.85 mg/g en el garbanzo (Saleh *et al.*, 2006).

En las leguminosas algunos factores antinutricionales pueden ser disminuidos o eliminados en etapas de remojo con tratamientos térmicos (Ahmadzadeh, 2007), debido a que el garbanzo utilizado no tuvo este tratamiento, se redujo la digestibilidad de la proteína en aproximadamente un 15 %.

Con los valores obtenidos del análisis bromatológico del garbanzo, además de los valores de REP_a y RPN_a, se puede decir que el garbanzo contiene una considerable cantidad de proteína, pero esta es mediana calidad comparada con la caseína, debido a su origen vegetal (Alais, 2003).

4.3. Biodisponibilidad del hierro

Las sales que se utilizan como suplementos de hierro contienen diferentes cantidades de este mineral, por ejemplo el fumarato ferroso contiene 30% de hierro, el sulfato ferroso 20%, y las sales orgánicas como el gluconato y lactato ferroso contienen 12 y 19% respectivamente. La solubilidad del fumarato ferroso es menor a la del sulfato ferroso, aunque se ha encontrado que la biodisponibilidad de estas dos sales es similar (Hurrell *et al.*, 2002).

En la tabla 13, se presentan los resultados obtenidos de la biodisponibilidad de hierro, la cual se evaluó mediante el balance de éste nutrimento en los animales empleados (ver anexo 7.5), reportando el porcentaje absorbido del mineral.

Tabla 13. Biodisponibilidad¹ de Hierro

Dietas	mg de Fe ingerido	mg de Fe en heces	% de Fe absorbido
Caseína	17.55	3.74	78.48
Caseína+ FFe	113.0	61.72	45.34
Caseína + CCa	15.50	3.86	76.47
Garbanzo	18.0	6.98	61.25
Garbanzo +FFe	125.0	68.77	44.99
Garbanzo+CCa	18.50	6.52	64.75

1. Los valores de biodisponibilidad se calcularon por duplicado con un pool de 3 ratas

Con respecto a las dietas de caseína, se observó mayor biodisponibilidad de hierro en las dietas de caseína y caseína adicionada con citrato de calcio, obteniéndose valores similares entre ellas (78.48 y 76.47%, respectivamente), mientras que la dieta de caseína adicionada con fumarato ferroso fue la que obtuvo el menor porcentaje de biodisponibilidad.

El comportamiento en las dietas de garbanzo fue el siguiente: se encontró mayor biodisponibilidad del hierro en la dieta de garbanzo al igual que en la dieta de garbanzo adicionado con citrato de calcio, mientras que la dieta de garbanzo adicionada con fumarato ferroso fue la que obtuvo un menor porcentaje de absorción de este mineral.

La mayor biodisponibilidad de hierro encontrada en las dietas que no fueron adicionadas con fumarato ferroso fue a consecuencia de una menor ingestión de hierro en comparación con las dietas que fueron adicionadas con hierro, por lo tanto la evaluación ideal de la biodisponibilidad de este nutrimento se debe hacer entre las dietas que fueron adicionadas de hierro, aunque estos resultados se deben tomar con reserva, ya que se debe tomar en cuenta que la cantidad de

hierro que contenían las dietas adicionadas con este mineral sobrepasaba a los requerimientos de las ratas que son de 200 mg de Fe/ kg de dieta y 10g Ca/ kg de dieta (Ait-oukhatar *et al.*, 1997), además de que el garbanzo por si solo aporta un pequeña cantidad de hierro. Por lo tanto, comparando la biodisponibilidad del hierro entre las dietas de caseína y garbanzo que fueron adicionadas con este mineral se obtuvieron valores muy similares; 45.34% para la dieta de caseína y 44.99% para la dieta de garbanzo.

4.4. Biodisponibilidad del calcio

Entre las sales utilizadas para la suplementación de calcio, el citrato de calcio tiene ventaja sobre las sales orgánicas como el lactato y el gluconato de calcio debido a la cantidad del nutrimento que aportan, ya que el citrato de calcio contiene un 21% de calcio mientras que las otras aportan 13 y 9% respectivamente. En cuanto a las sales inorgánicas como el carbonato de calcio esta contiene mayor cantidad de calcio (40%) pero tiene la desventaja de ser menos soluble (0.014g/L) que el citrato de calcio (0.9 g/L) (Heaney, 2001). Cabe destacar que otros autores han comprobado que la relación entre la solubilidad de la sal y la absorción de calcio no es lineal (Chaiwanon *et al.*, 2000).

En la tabla 14, se presentan los resultados obtenidos de la biodisponibilidad de calcio, la cual se evaluó mediante el balance de éste nutrimento en los animales empleados (ver anexo 7.5), reportando el porcentaje absorbido del mineral.

Los resultados de biodisponibilidad obtenidos fueron parecidos a los de hierro observándose una mayor biodisponibilidad de calcio en las dietas que no fueron adicionadas con calcio, mientras que las adicionadas presentaron un porcentaje de biodisponibilidad menor. Como fue mencionado anteriormente esto se debe a la menor cantidad de calcio presente en las dietas que no fueron adicionadas con citrato de calcio, ya que los animales al tener menor ingestión de calcio absorbieron la cantidad necesaria para cubrir con sus necesidades fisiológicas, en comparación con las dietas que fueron adicionadas con calcio en donde hubo mayor ingestión en relación al requerimiento por lo tanto los animales solo

absorbieron la cantidad necesaria (Campbell y Walsh, 2008) y lo demás lo desecharon.

Tabla 14. Biodisponibilidad¹ del Calcio

Dietas	mg de Ca ingerido	mg de Ca en heces	% de Ca absorbido
Caseína	0.95	0.23	75.29
Caseína+ FFe	0.80	0.11	86.12
Caseína + CCa	1.35	0.45	67.01
Garbanzo	0.47	0.036	92.38
Garbanzo +FFe	0.48	0.032	93.34
Garbanzo+CCa	0.79	0.127	84.12

1. Los valores de biodisponibilidad se calcularon por duplicado con un pool de 3 ratas

Cabe destacar que los valores de biodisponibilidad de calcio mostraron diferencias entre las dietas elaboradas a base de caseína y las de garbanzo, por ejemplo comparando la dieta de caseína y garbanzo se observó que fue mayor la biodisponibilidad del calcio en la dieta de garbanzo (92.38%) que en la de caseína (75.29%). En general las dietas a base de garbanzo mostraron valores elevados de biodisponibilidad de calcio en comparación con las de caseína, pero esto se puede deber a que la ingestión de este mineral fue menor en las ratas que fueron alimentadas con las dietas a base de garbanzo. Como se puede ver en la tabla 14 el calcio ingerido fue menor en las dietas a base de garbanzo que en las de caseína, por lo que no se puede hacer una comparación entre estas dietas, observándose el mismo efecto, las ratas que ingirieron menor cantidad de calcio absorbieron un mayor porcentaje para cubrir con sus requerimientos.

4.5. Balance de energía

En la tabal 15, se muestran los valores del total de nutrimentos digeribles (TND), la energía gruesa de la dieta (EG) determinada experimentalmente con bomba

calorimétrica, la energía digerible (ED) experimental y la energía metabolizable (EM) calculada teóricamente.

En todos los casos se observa que la cantidad de energía digerible (ED) es mayor a la energía metabolizable, esto es de esperarse, ya que la energía digerible es el total de energía que el animal puede absorber de la dieta. El valor de la ED se obtiene restando a la energía gruesa ingerida, la energía contenida en las heces.

Una fracción de la energía absorbida en el tubo gastrointestinal no es aprovechada y es eliminada por la orina en forma de compuestos nitrogenados provenientes del catabolismo de los aminoácidos como urea, creatinina y ácido úrico. De esta manera, la energía metabolizable es la cantidad de energía proveniente del alimento que el animal dispone para sus procesos metabólicos, ya que se toma en cuenta la cantidad de energía excretada tanto en heces, como en orina (Mora, 2007).

Tabla 15. Valores de TND, EG, ED y EM de las dietas evaluadas

Dietas	TND (g/g)	EG (kJ/g)	ED (kJ/g)	EM (kJ/g)
Caseína	1.06	16.29	15.32	14.08
Caseína + CCa	1.06	16.20	14.88	14.0
Caseína+ FFe	1.06	16.67	15.95	14.41
Garbanzo	1.06	18.60	17.40	16.58
Garbanzo +CCa	1.06	16.90	15.78	15.06
Garbanzo + FFe	1.07	19.73	18.94	17.57

TND: total de nutrimentos digeribles, EG: energía gruesa de la dieta, ED: energía digerible, EM: energía metabolizable

La energía gruesa esperada en las dietas era de 18 kJ/g, ya que estas deben ser isoenergéticas. Como se muestra en la tabla 14 la energía gruesa de las dietas de caseína presentaron un valor de alrededor del 16 kJ/g en tanto que en las dietas de garbanzo ésta fue de 17 a 19 kJ/g. Esto se debió a que no se pesó la cantidad

adecuada de caseína en la elaboración de las dietas sobreestimando la pureza de esta, suponiendo que esta tenía un 94% de pureza según la información del proveedor resultando que en el análisis de las dietas estas contenían menos del 10% de proteína. Analizando la pureza de la caseína esta resulto del 83%.

En la tabla 16, se muestran los valores de energía ingerida, energía fecal, energía absorbida y el porcentaje de energía absorbida. Estos resultados se obtuvieron utilizando los valores de energía gruesa de la dieta y de las heces, así como la cantidad de alimento ingerido durante la última semana del ensayo y el peso de las heces recolectadas.

Tabla 16. Balance de energía¹

Dietas	Energía total ingerida kJ	Energía fecal kJ	Energía total absorbida kJ	% Energía absorbida
Caseína	7048.68	413.64	6635.04	94.06
Caseína+ FFe	6073.71	262.22	5811.50	95.68
Caseína + CCa	6326.91	567.20	5804.21	91.12
Garbanzo	7210.29	466.13	6744.16	93.53
Garbanzo + FFe	7474.71	301.3	7064.0	94.51
Garbanzo + CCa	6465.94	410.76	6035.58	93.38

Se calculó con dos pool provenientes de 3 ratas

Los valores encontrados en el balance de energía muestran que en general los animales tuvieron un buen aprovechamiento de la energía, debido a que el porcentaje de energía absorbida es en promedio del 94%.

El porcentaje de energía absorbida encontrado concuerda con el reportado en la literatura ya que no toda la energía que proporciona un alimento puede ser absorbida, tomando en cuenta que la fibra contribuye a la energía total de un alimento pero esta no es digerible (Moreno, 2000)

5. CONCLUSIONES

- Se determinó la calidad proteínica del garbanzo *Cicer arietinum L.* mediante su análisis bromatológico y los valores de REP y RPN, los cuales confirman que la calidad de su proteína, en comparación con la caseína es de mediana calidad.
- La digestibilidad aparente de la proteína del garbanzo fue menor (63.17 %) en comparación con la caseína (85.47 %)
- Los valores de digestibilidad aparente en las dietas que fueron adicionadas con las sales, se vieron afectados, observándose una mayor digestibilidad de las proteínas con la adición de fumarato ferroso aumentando en un 4 y 8 % la digestibilidad de la caseína y garbanzo respectivamente. Por otra parte con la adición del citrato de calcio se vio disminuida la digestibilidad en un 5 y 8% respectivamente.
- No se logró calcular la biodisponibilidad del fumarato ferroso y citrato de calcio con la metodología empleada, debido a que la cantidad adicionada de las sales fue superior al requerimiento de los animales, además de que no se tomó en consideración la cantidad de estos nutrimentos que aporta el garbanzo.
- Se calculó el balance de energía en las ratas empleadas en el ensayo biológico, en donde se determinó que alrededor del 94 % de la energía que se ingiere es absorbida por los animales.
- Los datos de REP, RPN y digestibilidad aparente obtenidos en este trabajo servirán para elaborar una base de datos para la asignatura "Laboratorio

nutrimental de alimentos” que posteriormente pueden ser enriquecida empleando diferentes alimentos.

Perspectivas

- El estudio realizado para evaluar la biodisponibilidad de las sales de hierro y calcio servirá para mejorar los protocolos que serán usados en estudios posteriores. Es recomendable tomar en cuenta el requerimiento de los animales para calcular la cantidad de calcio y hierro adicionados. Así mismo, es importante considerar el uso de una mezcla de sales libre de estos minerales en la elaboración de las dietas.
- Realizar más estudios acerca de la biodisponibilidad del hierro y del calcio usando diferentes sales, así como el alimento al cual se adicionan.
- Realizar más estudios acerca de la influencia que pueden tener el hierro y el calcio sobre la absorción de los aminoácidos

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A., Dauvillier, P., (2000). Análisis nutricional de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 247-262.
- Ahmadzadeh G. R., Prakash J., (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds, *ScienceDirect* 40:1292–1299.
- Ait-oukhatar N., Bouhallab S., Bureau F., Arhan P., Maubois J., Drosdowsky M., Dominique L. (1997). Bioavailability of caseinophosphopeptide bound iron in the young rat, *J. Nutr. Biochem.* 8: 190-194.
- Alais. Ch.,(2003), *Ciencia de la leche*, 4ª edición, Editorial Reverté, S.A., España, pp. 817-818.
- Allen L.H. Calcium bioavailability and absorption, (1982) *Am.J.Clin Nutr.* 35, 783-808.
- Anderson L.M.(1988). *Nutrición humana, Principios y aplicaciones*, 2ª edición, Ed. Bellaterra, S.A, España, pp 41-49.
- Anderson J.JB., Garner S.C.G. (1996), Dietary issues of calcium and phosphorus, En J.B Jhon (Ed), *Calcium and phosphorus in Health and Disease*. Florida
- AOAC, (2005) *Official methods of analysis of AOAC International*, Hoewitz, W. Ed., 17ª ed., Vol II (45.3.04), Gathersburg.
- Appel.(1997). Minimizes Bone Turnover in Overweight Adults during Weight Loss. *J. Nutrition* 134: 568-573.
- Aranceta J. Gil A. (2005). *Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil*, Panamericana, Madrid España, pp.7-8.
- Argiratos y Samman. (1994). The effect of Calcium carbonate and Calcium citrate on the absorption of zinc in health female subjects. *Eur. J Nutri:* 45 pp.198-204.
- Astrup A., (2011). Calcium for prevention of weight gain, cardiovascular disease, and cancer. *Am J Clin Nutr* ;94:1159–60.
- Atkins, P., (2008), *Química Física*, 8a edición, Médica panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp 38.
- Attia, R.S., El-Tabey Sheshata, A. M., Aman, M.E. and Hamza, M.A. (1994) Effect of cooking and decortication on the physical properties, the chemical composition and the nutritive value of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chem:* 50 125-131
- Aykroyd W.R. and Doughthy, J. (1982). *Las leguminosas en la nutrición humana .Alimentación y nutrición*. Colección FAO. Roma, Italia. pp.152.
- Barzel, U.S., Massey L.K. (1998).Excess dietary protein can adversely affect bone. *j nutri* 128, 1051-1053,

- Barger-Lux MJ, Heaney RP, MR Stegman. (1990) Efectos de la ingesta moderada de cafeína en la economía del calcio de las mujeres premenopáusicas. *Am J Clin Nutr.*; 52 (4):722-725.
- Beach S.B., Hansen M., Bukhave K., Jensen M., Sorensen S.S., Kristensen L. (2003). Nonheme iron absorption from a phytate rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am J Clin Nutr* 77, 173-179.
- Beard J.L., Connor J.R., (1984). Iron status and neutral functioning. , *Reviw of Nutrition* 23, 41-58.
- Bello G.J, (2005). Calidad de vida y salud humana: fundamentos científicos, ediciones Díaz santos, Madrid España, pp. 233-234.
- Bender, A., Doell, B. (1957).Biological evaluation of protein: a new aspect. *Brit. J. Nutr.* 11:140-147.
- Bosscher D., Van Caillie- Bertrand M., Van Cauwenbergh R., Deelstra H., (2003) Availabilities of calcium, iron, and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions, *Nutrition* 19: 641-645.
- Brooks G. H., (1997).Metabolismo muscular y actividad física. Deficiencia de hierro. CESNI. Buenos Aires. Argentina. pp. 67-85.
- Bronner F. (1987). Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J. Nutri* 117, 1347-1352.
- Bothwell T.H., Baynes R.D., MacFarlane B.J., MacPhail A.P. (1989), Nutritional iron requirements and food iron absorption, *J. Inter Medi* 226, 357-365.
- Calvo MS. (2000). Consideraciones dietéticas para evitar la pérdida de hueso y la función renal. *Nutrición USA.*; 16 (8):564-566.
- Campbell y Walsh, (2008).Urología, Vol. 2, 9ª edición, Panamericana. S.A, Argentina, pp 1371-1372.
- Carias D., Cioccia A., Heina P., (1995), Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteína animales y vegetales medidas *in vivo* e *in vitro* y su efecto sobre el cómputo químico, *Arch.Latinoam.Nutr*, 45(2):111-6.
- Castelán M.A., (2010). Repunta producción de garbanzo. El Independiente de Hidalgo. Recuperado 02 de julio de 2011 de <http://www.elindependientedehidalgo.com.mx/index.php/component/content/article/63-tulancingo-/18264-20100802-p10-n1>
- Chaiwanon P., Puwastien P., Nitithamyong A., and Prapaisri P., (2000), Calcium fortification in soybean milk and in vitro bioavailability, *j. food. Comp. and analy.* 13, 319-327.
- Clemente A., Vioque J., Sanchez R., Pedroche J., Bautista J., Milla F. (1999). Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates, *Food Chemistry* 67: 269- 274.
- Conrad M.E, Umbreit J.N., (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis*; 29(3):336.
- Cornejo R. y Barrón J.M, Falcon M.R y Moreno S. (2010), Evaluación de la calidad Proteica por Bioensayos de tres líneas avanzadas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) para la región noroeste de México, Tercer congreso de Ciencias Alimentarias y Biotecnología, Universidad de Sonora, pp. 1285-1299.

- Cota G.A., Yañez F. Greda A., Esquer M. Elsa J., Anduaga C., Barrón H. , (2010). Efecto de la variedad y la fertilización en indicadores de calidad proteica in-vitro de dos variedades y una línea de garbanzo (*cicer arietinum*), *Rev Chil Nutr* V 37(2),193-200.
- Cook J.D., Reddy M.B., Hurrell R.F., (1995). The effect of red and white wines on nonheme iron absorption in humans. *Am. J. Clinical Nutr* 61, 800-804.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. (1993) Un estudio prospectivo de calcio y otros nutrientes y el riesgo de cálculos renales sintomáticos. *N Engl J Med.*, 328 (12): 833-838.
- Darragh J., A., Hodgkinson M., S., (2000). Quantifying the Digestibility of Dietary Protein. *J. Nutri.* 2000;130:1850S-1856S.
- Darnton-Hill I, Webb P, Harvey PW, Hunt JM, Dalmiya N, Chopra M, et al.(2005). Micronutrient deficiencies and gender: social and economic costs. *Am J Clin Nutr*, 81(5):1198-1205.
- Darnton-Hill I, Coyne E.T., (1998). Feast and famine: socioeconomic disparities in global nutrition and health. *Public Health Nutr*, 1(1):23-31.
- Davidsson L., Dimitrion T., Walczyk T., Hurrell R:F., (2001). Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (*Pisum sativum*) protein isolate: the effect of phytic acid ascorbic acid. *British j Nutri* 85, 59-63.
- De Miguel, G. E. (1991). El garbanzo: Una alternativa para el seco. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp.200-208.
- FAO/OMS, (1991). Necesidades de vitamina A, hierro, folato, y vitamina B12, Informe de consulta mixta, Estudios FAO Alimentación y nutrición, Roma No 23, 48-55.
- FAO/WHO (2001). Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/ WHO expert consultation, Bangkok, Thailand.
- FAO (2011), Economic And Social Department: The Statistical Division. Recuperado el 16 de Julio de 2011 de <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?item=191&lang=es&year=2005>.
- Farré R., Barberá R., Lagarda M.J. (1985). Contaminación metálica de los alimentos: cromo y cobalto. *Alimentaria*, p.41-49.
- Food and Nutrition Board, del Instituto de Medicina (1997). Ingestas dietéticas de referencia: calcio, fósforo, magnesio, vitamina D y el fluoruro. Washington, DC: National Academy Press, pp.71-145.
- García, M.N., Martínez, T.C., Layrisse, M. (1996).Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: iron absorption in humans from diets containing cooked fractions. *The j Nutri Biochemi* 7, 49-54.
- Gavin M.W., McCarthy D.M., Garry P.J. (1994). Evidence that iron stores regulate iron absorption a setpoint theory, *Am.J Clini Nutri* 59, 1376-1380
- Guerrero G, A. (1999). Cultivos herbáceos extensivos, 6^{ta} edición, Ediciones Mundi- Prensa, Barcelona España, pp 623-638.
- Gil Ángel, Tratado de Nutrición Tomo II, (2010). Composición y Calidad Nutricional de los Alimentos, 2^a edición, Panamericana, México, pp 132, 162-163.

- Gleerup A., Rossander-Hulthen L., Halberg L., (1993). Duration of the inhibitory effect of calcium on non heme iron absorption in man. *Euro J Clini Nutri* 47, 875-879.
- Guéguen L., Pointillart A., (2000). The bioavailability of dietary calcium, *J Ame College Nutri* 19, 136.
- Halberg L., (1998). Does calcium interfere with iron absorption? .*The Ame J Clini Nutri* 68, 3-4.
- Herrera R., C., Bolaños V., N., (2003). Química de alimentos Manual de laboratorio, 1ª edición , universidad de Costa Rica, San José Costa Rica , pp 114.
- Honavar, P.M., Shih Cheng V. and Liener, LE. (1962). Inhibition of growth of rats by purified hemagglutinin fraction isolated from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutr.* 77:109-114.
- Harris SS, Dawson-Hughes B. (1994). La cafeína y la pérdida ósea en mujeres postmenopáusicas sanas. *Am J Clin Nutr.* 60 (4): 573-578.
- Heaney, Robert P. (2001) Factores que influyen en la medición de la biodisponibilidad, el consumo de calcio como un modelo. *J of Nutri.* 131:1344 S-1348S.
- Heath, A.L., Fairweather-Tait S.J. (2002). Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. *Best Practice and Research. Clinical Haematology* 15, 225-241.
- Hernández M. C., Bourges H.A., (1996). Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Edición INEGI, publicación L-12 10-A México pp 31-32.
- Hernandez R.M. Tratado de nutrición (1999), Ediciones Díaz santos, Madrid, pp. 111-1112.
- Hernández TM, Porrata MC, (1999). Calcio, osteoporosis, hipertensión arterial y cáncer colo rrectal. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 13(1):33-45.
- Hurrell, R. F., Bothwell, T., Cook, J. D., Dary, O., Davidsson, L., Fairweather-Tait, S., Hallberg, L., Lynch, S., Rosado, J., Walter, T., Whittaker, P. (2002). The usefulness of elemental iron for cereal flour fortification: A Sustain Task Force Report. *Nutrition Reviews*, 60, 391-406.
- Idouraine A., Khan M.J., Weber C.C, (1996). In vitro binding capacity of wheat bran rice bran and oat fiber for Ca, Mg, Cu and Zn alone and in different combinations. *J Agri Food Chem* 44, 2067-2072.
- INEGI (2009), Estadísticas históricas de México, tomado de:
http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/historicas10/Tema8_%20Agropecuario,aprovechamiento_forestal_y_pesca.pdf.
- Kathleen, M. (2001). Nutrición y dietoterapia de Krause. Ed Mc Graw-Hill Interamericana, 10ª edición, México, pp 122-143.
- Layrisse, M., Casal M.N., Solano L., Baron M., Arguello F., Llovera, D., Ramírez, J. Leets I., Tropper E., (1997). The role of vitamin A on the inhibition of non-heme iron absorption. *The J of Nutri Bioche* 8: pp.61.
- Lawson, M.S., Thomas M., Hardiman A. (1998). Iron status of Asian Children aged 2 years living in England. *Arch in Dese Chil* 78, 420-426.
- Leninher, A.L, Cox M.M. (1995). Principios de bioquímica, 2ª edición, Omega,

- López, M. J., Nutrición y salud para todos, (2004) , 2ª edición, Ed. Trillas, México, pp 63-68, 148-150.
- Lorenzo, P. Moreno A., Iizasoain I., Leza J.C., Moro M.A. Portolés A., (2004), Farmacología básica y clínica 18ª edición, panamericana, Buenos Aires, pp 746-748.
- Lloy, E.L, McDonald, B.E., Crampton, E.W.(1999). Ed Acribia S.A. Zaragoza España, pp 228-229.
- Lloyd T, Johnson-N Rollings, Egli DF, Kieselhorst K, Mauger EA, Cusatis DC (2000). Estado del hueso en mujeres posmenopáusicas con diferentes tomas de cafeína habitual: una investigación longitudinal. *J Am Coll Nutr*; 19 (2):256-261.
- Martinez, C., Leeb I., Taylor P., Ramírez J., del valle Camacho M., Layrisse M.,(1986). Heme, ferritin and vegetable iron absorption in humans from meals denatured of heme iron during the cooking of beef. *The j of Nutri* 116, 1720-1725.
- Matarese E.L., Gottschlich M.M., (2004). Nutrición clínica practica, 2ª edición, Elsevier, Génova, España, pp.177-179.
- Matkovic, V., Ilich J.Z , Andon M.B., Hirsch L.C., Tzagournis M.A., Lager B.J., Goel P.K., (1995). Urinary calcium, sodium, and bone mass of young females, *The Ame j Clini Nutri* 62, 417-425.
- Matti, T., (1998). Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición, Ed. Acribia S.A., Barcelona España pp 211-213.
- Meehye K., Dong T. L., Yeon S. L., (1995). Iron absorption and intestinal solubility in rats are influenced by dietary proteins, *Nutriti Rese*, Vol. 15, No. 11, pp. 1705-1716.
- Mejia, L.A., Arroyave G.,(1982).The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *The Ame J of Clini Nutri* 36, 87-93.
- Messina, M.J., (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 439-450.
- Miller D.S., Payne P. R., *British Journal of Nutrition* (1959), publicado en 2007 *British J Nutri* 13: pp 501-508. http://journals.cambridge.org/abstract_S0007114559000654.
- Mora, I.B., (2007). Nutrición animal, 3ª edición, Ed. Universidad Estatal a Distancia. San Jose, Costa Rica, pp. 21-24.
- Moreno, R. R. Nutrición y dietética para tecnólogos de alimentos, (2000). Ed. Díaz de Santos S.A., Madrid, pp. 166- 172, 180-185.
- Muir A., Hopfer U. (1985). Regional specificity of iron uptake by small intestinal brush-border membranes from normal and iron deficient mice., *Gastrointestinal and liver pathology* 11, 6376-6383.
- Mulvihill B., Kirwan F.M., Morrissey P.A., Flynn A., (1998). Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non hem iron. *Inte. J Food Scien Nutri*. 49, 187-192.
- Muñoz, C.M, Tablas de valor nutritivo de los alimentos. (1996), Editorial pax, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubiran, México pp.39.
- Nadal M,S., Moreno Y,T., Cubero S,J.,(2004) Las leguminosas grano en la agricultura moderna, Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona España, pp. 105-108.

- Norma oficial mexicana Nom-086-ssa1-1994, bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Revisado en <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/086ssa14.html>
- Olaiz, F.G., Rivera, D. J., Shamah, L. T., Rojas R, Villalpando, H.S, Hernández, A. M., Sepúlveda, A.J. (2006). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Padilla V.,I., Valenzuela V., R., Armenta C.C., Salina P.R., Sánchez S., E., (2008). Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el valle de mayo, Sonora, México, *Rev.Fitotec.Méx* 31 (1) pp. 43-49.
- Peres J.M., Bouhallab S., Bureau F., Maubois J.L., Arhan P., Bougle D., (1999). Reduction of iron/zinc interactions using metal bound to the caseinphosphopeptide 1-25 of β -casein. *Nutri Res* 19, 1655-1663.
- Periago M.J., Ros G., Martínez M.C., Rincón F. (1997). Influencia de inhibidores de tripsina y el ácido fítico sobre la digestibilidad in vitro de la proteína en legumbres de la dieta mediterránea., *Rev. Alimentaria*. 113 (7), 193-197.
- Prentice, A., (1997). Is nutrición important in osteoporosis? *Proce of the Nutri Soci* 56, 357-367.
- Raja, K.B., Simpson R.J., Peters T.J.; (1987). Comparison of $^{59}\text{Fe}^{3+}$ uptake in vitro and in vivo by mouse duodenum, *Bio Biophy Acta* 901, 52-60.
- Rang, H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J., (2006) Farmacología, 6ª edición, Elsevier, España, pp 349-350.
- Requejo M. Ana, Ortega M. Rosa, Manual de nutrición clínica en atención primaria, 1ª edición, Ed. comlutense, España 2000, pp 171-172.
- Repetto J.M., Repetto k.G., (2009), Toxicología fundamental, 4ª edición, Días santos, Madrid España, pp. 31
- Rianon, N., Feeback D., Wood R., Driscoll T., Shackelford L., Leblanc A., (2003). Monitoring sweat calcium using skin patches, *Calcified Tissue International* 72, 694-697.
- Robinson, D. S.(1991). Bioquímica: Valor nutritivo de los alimentos, Ed Acribia S.A México, pp 299-300.
- Rodak F.B., (2004). Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas, 2ª edición, Medica panamericana , Buenos Aires, Argentina, pp.117-120.
- Rossander, H.L., Brune M., Sandstrom B., Lonnerdal B., Halberg L., (1991). Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am J Clini Nutri* 54, 152-156.
- Rose D, Smallwood D, Blaylock J. (1995) Socio-economic factors associated with the iron intake of preschoolers in the United States. *Nutr Res*; 15: 1297-1309.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://www.aserca.gob.mx/sicsa/fygnacional/frj_ca4.asp , visita 2 de febrero del 2012,

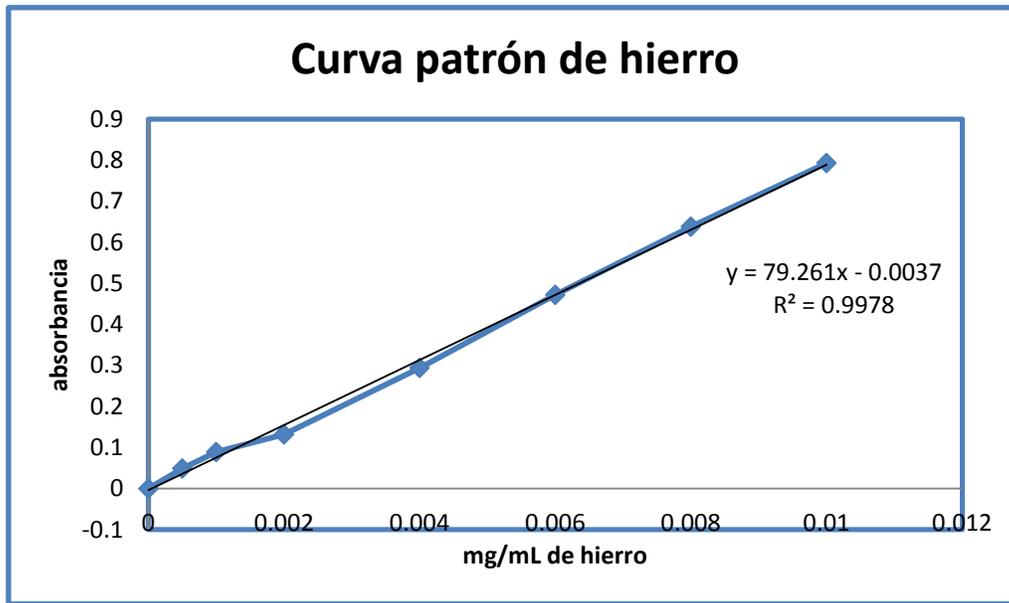
- Saleh A. Alajaji, Tarek A. El-Adawy (2006). Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods, *J Food Compo Analy* 19 pp. 806–812.
- Sammam S., Sandstrom B., Toft M.B., Bukhare K., Jensen M., Sorensen S.S., Hansen M. (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme iron absorption. *Am J Clin Nutr* 73, 607-612.
- Sierra A., I., Morante Z., S., Pérez Q., D., (2007). Experimentación en química analítica. Editorial Dykinson, S.L. Madrid, España. pp. 85-88, 109-111
- Singh, U., and Jambunathan, R (1981). Studies on desi and kabuli chickpea (*C. arietinum* L.) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and protein digestibility. *J. Food Sci.* 46: 1364- 1367.
- Soriano, C.M. (2006), Nutrición básica humana, primera edición, Guada Impresores, España, pp 220-224, 280-283.
- Yust M., Justo P., Millán L., Alcaide J., Millán F. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase, *Food Chemistry* 122: 1212–1217.
- Suárez, T., Torrealba M., Villegas N., (2005). Deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B₁₂ en relación a anemia, en adolescentes de una zona con alta incidencia de malformaciones congénitas en Venezuela”, *Arch Latinoam Nutri*, 55(2) pp 118-119.
- Teucher B., Olivares M., Cori H., (2004). Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acid. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 74, 403-419.
- Tolonen, M. (1995). Vitaminas y Minerales en la Salud y la Nutrición. Zaragoza - España. Editorial Acribia S.A. p 300.
- Ulloa, J.A., Valencia E. M., (1992). Calidad nutritiva de un concentrado proteínico de garbanzo (*Cicer arietinum*) obtenido por ultrafiltración, *Archi Latinoame Nutri*, 42:4 pp.428-431.
- Vásquez, C. De Cos A. I. (2005). Alimentación y Nutrición, 2ª edición, Díaz de santos, Madrid España, pp. 29-30.
- Velásquez, U.G. (2006). Nutrición y dietética, 1^{era} edición, Ed. Universidad de Antioquia, Colombia, pp 87-94.
- Venegas S.O., (2011). Tesis: Elaboración de una base de datos de consulta referente a la calidad nutritiva proteica de diferentes alimentos de origen animal y vegetal, Facultad de Química UNAM, pp 48-55.
- Vitali D., Vadrina, D. I., Sebecic B., Vujic L., (2007). Impact of modifying tea biscuit composition on phytate levels and iron content and availability. *Food Chemis* 102: 82-89.
- Wauben, I., Wainwright P. (1999). The influence of neonatal nutrition on behavioural development: a critical appraisal. *Nutr Rev*; 57:35-44.
- Weaver, C.M., Heaney, R.P., Shils M, Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C., (1999). Modern Nutrition in Health and Disease. 9th ed. Baltimore:Williams & Wilkins; pp.141-155.
- Whitaker, J.R. (1988), Food Proteins (in: Proc. protein Co-Prod. Symp). Ed. Kinsella, J.E., Soucie, W.G. Am. Oil Chem. Soc. Champaign, pp. 354-380.

Whiting, S.J; Anderson, D.J, Weeks S.J, (1997). Calciuric effects of protein and potassium bicarbonate but not of sodium chloride or phosphate can be detected acutely in adult women and men. *Am j clini Nutri*: 65 1465-1472.

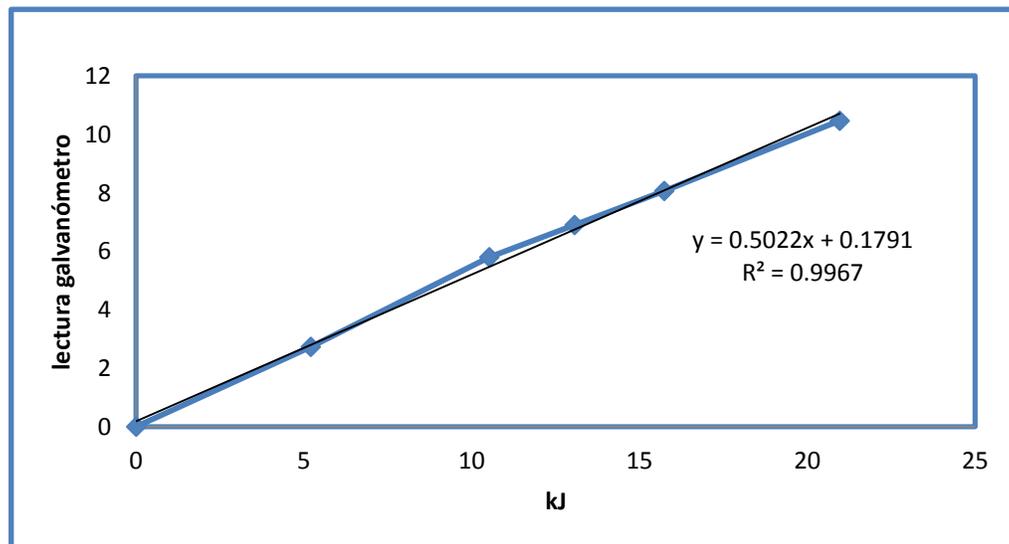
Yates J. (1995) Radiographic, absorptiometry in the diagnosis of osteoporosis. *Am J Medicine*; 98(2):41-47.

7. ANEXOS

7.1 Curva estándar para hierro



7.2 Curva estándar de ácido benzoico



7.3 Registro de peso acumulado y alimento ingerido de las ratas

LOTE 1. Dieta a base de Caseína

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>29.1 g</u> Dieta: <u>Cas 1</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal ($P_{\text{día}}$)	31.4	34.2	41	45	50.6	62.0	68.7	77.1	83.7	90.0	93.4	104.5		
Incremento acumulado ($P_{\text{día}}-P_i$)	2.3	5.1	11.9	15.9	21.5	32.9	39.6	48.0	54.6	60.9	64.3	75.4		
Alimento inicial (I)	259.9	281.8	310.8	283.8	285.5	299.0	289.9	280.5	299.7	283.2	288.7	287.8		
Alimento final (F)	253.7	271.0	283.8	275.1	268.7	270.7	268.1	259.4	265.3	259.8	266.2	248.4		
Alimento ingerido ($AI=I-F$)	6.2	10.8	27	8.7	16.8	28.3	21.8	21.1	34.4	23.4	22.5	39.4		
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}	6.2	17.0	44.0	52.7	69.5	97.8	119.6	140.7	175.1	198.5	221.0	260.4		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>40.5 g</u> Dieta: <u>Cas 2</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal ($P_{\text{día}}$)	44.9	49.0	63.0	66.3	76.8	89.2	92.0	99.3	105.6	110.5	116.0	131.0		
Incremento acumulado ($P_{\text{día}}-P_i$)	4.4	8.5	22.5	25.8	36.3	48.7	51.5	58.8	65.1	70.0	75.5	90.5		
Alimento inicial (I)	230.1	250.5	277.3	248.8	249.8	264.4	250.8	256.3	282.5	264.6	269.8	265.7		
Alimento final (F)	220.3	237.8	243.1	239.2	225.7	229.5	231.1	242.1	248.6	241.9	247.7	222.8		
Alimento ingerido ($AI=I-F$)	9.8	12.7	34.2	9.6	24.1	34.9	19.7	14.2	33.9	22.7	22.1	42.9		
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}	9.8	22.5	56.7	66.3	90.4	125.3	145.0	159.2	193.1	215.8	237.9	280.8		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 43.2 g Dieta: Cas 3 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	49.0	54.9	69.4	73.0	79.4	86.6	89.0	96.0	104.3	112.4	118.5	130.7		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	5.8	11.7	26.2	29.8	36.2	43.4	45.8	52.8	61.1	69.2	75.3	87.5		
Alimento inicial (I)	286.3	302.4	327.8	296.9	298.5	318.7	309.0	307.5	330.5	310.1	313.2	324.0		
Alimento final (F)	272.2	288.8	291.4	287.8	278.5	288.7	292.0	284.6	294.7	285.1	288.3	286.1		
Alimento ingerido (AI=I-F)	14.1	13.6	36.4	9.1	20.0	30.0	17.0	22.9	35.8	25.0	24.9	37.9		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	14.1	27.7	64.1	73.2	93.2	123.2	140.2	163.1	198.9	223.9	248.8	286.7		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 49.0 g Dieta: Cas 4 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	54.1	60.5	75.8	79.0	83.4	90.0	94.4	101.2	103.4	121.7	134.0	143.5		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	5.1	11.5	26.8	30.0	34.4	41.0	45.4	52.2	54.4	72.7	85.0	94.5		
Alimento inicial (I)	249.4	263.9	289.8	261.0	265.5	280.9	269.2	262.5	295.2	271.6	268.7	285.4		
Alimento final (F)	234.6	247.3	249.6	251.4	245.2	249.6	248.3	239.5	254.2	243.5	240.7	240.4		
Alimento ingerido (AI=I-F)	14.8	16.6	40.2	9.6	20.3	31.3	20.9	23.0	41.0	28.1	28.0	45.0		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	14.8	31.4	71.6	81.2	101.5	132.8	153.7	176.7	217.7	245.8	273.8	318.8		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>49.0 g</u> Dieta: <u>Cas 5</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	53.5	63.4	81.0	86.0	90.0	99.4	105.5	113.4	129.2	137.0	147.2	161.0		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	4.5	14.4	32.0	37.0	41.0	50.4	56.5	64.4	80.2	88.0	98.2	112.0		
Alimento inicial (I)	233.9	248.7	267.5	233.8	252.0	268.2	251.7	252.8	278.9	253.1	251.2	269.0		
Alimento final (F)	218.7	227.5	222.7	222.0	228.5	231.0	224.7	225.0	233.4	225.5	220.4	224.7		
Alimento ingerido (AI=I-F)	15.2	21.2	44.8	11.8	23.5	37.2	27.0	27.8	45.5	98.2	30.8	44.3		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	15.2	36.4	81.2	93.0	116.5	153.7	180.7	208.5	254.0	352.2	383.0	427.3		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>55.5 g</u> Dieta: <u>Cas 6</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	55.3	66.8	78.4	84.3	87.0	96.5	101.2	108.5	106.1	126.0	131.5	142.7		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	-0.2	11.3	22.9	28.8	31.5	41.0	45.7	53.0	50.6	70.5	76.0	87.2		
Alimento inicial (I)	232.0	251.3	272.5	236.6	253.0	269.3	250.0	259.0	313.7	284.1	272.8	276.4		
Alimento final (F)	220.5	230.2	226.6	223.7	230.6	229.5	223.7	230.9	273.2	254.9	245.0	234.3		
Alimento ingerido (AI=I-F)	11.5	21.1	45.9	12.9	22.4	39.8	26.3	28.1	40.5	29.2	27.8	42.1		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	11.5	32.6	78.5	91.4	113.8	153.6	179.9	208.0	248.5	277.7	305.5	347.6		
Observaciones: _____														

LOTE 2. Dieta a base de caseína con citrato de calcio.

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>35.7 g</u> Dieta: <u>Cas + Ca 1</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	49.6	45.3	56.0	59.5	66.0	75.7	78.5	84.8	92.9	98.7	105.8	116.6		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	13.9	9.6	20.3	23.8	30.3	40.0	42.8	49.1	57.2	63.0	70.1	80.9		
Alimento inicial (I)	280.3	295.7	325.5	300.7	312.7	332.5	311.1	320.7	344.6	315.0	311.3	317.7		
Alimento final (F)	270.9	281.0	294.3	292.1	294.3	304.3	291.9	299.6	310.6	291.8	288.8	281.6		
Alimento ingerido (AI=I-F)	9.4	14.7	31.2	8.6	18.4	28.2	19.2	21.1	34.0	23.2	22.5	36.1		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	9.4	24.1	55.3	63.9	82.3	110.5	129.7	150.8	184.8	208.0	230.5	266.6		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>37.6 g</u> Dieta: <u>Cas + Ca 2</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	42.8	47.7	59.3	63.5	71.5	80.5	84.8	88.4	97.1	101.8	107.2	120.0		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	5.2	10.1	21.7	25.9	33.9	42.9	47.2	50.8	59.5	64.2	69.6	82.4		
Alimento inicial (I)	235.8	249.6	278.4	253.2	261.4	276.7	256.9	266.1	298.6	267.9	266.9	266.0		
Alimento final (F)	225.4	236.2	247.3	243.7	241.0	246.9	236.9	245.4	262.5	245.2	242.7	226.8		
Alimento ingerido (AI=I-F)	10.4	13.4	31.1	9.5	20.4	29.8	20.0	20.7	36.1	22.7	24.2	39.2		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	10.4	23.8	54.9	64.4	84.8	114.6	134.6	155.3	191.4	214.1	238.3	277.5		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 47.4 g Dieta: Cas + Ca 3 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal ($P_{\text{día}}$)	48.6	58.1	71.5	74.5	78.3	85.9	88.7	94.5	101.4	111.5	116.9	129.0		
Incremento acumulado ($P_{\text{día}}-P_i$)	1.2	10.7	24.1	27.1	30.9	38.5	41.3	47.1	54.0	64.1	69.5	81.6		
Alimento inicial (I)	234.5	247.6	273.4	245.2	260.7	276.5	261.5	271.0	308.1	276.9	266.8	276.1		
Alimento final (F)	222.9	229.2	234.1	234.8	241.1	247.7	241.8	249.9	275.4	251.7	243.9	237.9		
Alimento ingerido ($AI=I-F$)	11.6	18.4	39.3	10.4	19.6	28.8	19.7	21.1	32.7	25.2	22.9	38.2		
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}	11.6	30.0	69.3	79.7	99.3	128.1	147.8	168.9	201.6	226.8	249.7	287.9		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 48.0 g Dieta: Cas + Ca 4 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal ($P_{\text{día}}$)	47.6	57.7	69.0	71.5	74.0	82.9	85.4	92.5	102.7	111.2	119.5	119.8		
Incremento acumulado ($P_{\text{día}}-P_i$)	-0.4	9.7	21.0	23.5	26.0	34.9	37.4	44.5	54.7	63.2	71.5	71.8		
Alimento inicial (I)	277.8	292.9	215.5	287.7	300.6	315.6	297.1	300.9	326.5	297.2	304.2	309.3		
Alimento final (F)	266.0	272.6	278.5	276.4	281.3	281.3	276.4	275.8	287.7	270.5	276.8	271.2		
Alimento ingerido ($AI=I-F$)	11.8	20.3	37.0	11.3	19.3	34.3	20.7	25.1	38.8	26.7	27.4	38.1		
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}	11.8	32.1	69.1	80.4	99.7	134.0	154.7	179.8	218.6	245.3	272.7	310.8		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>50.2 g</u> Dieta: <u>Cas + Ca 5</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	49.6	61.4	74.0	77.0	80.0	88.0	91.0	99.1	109.6	118.9	128.4	137.1		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	-0.6	11.2	23.8	26.8	29.8	37.8	40.8	48.9	59.4	68.7	78.2	86.9		
Alimento inicial (I)	231.8	249.9	273.8	245.5	258.0	276.8	255.1	256.8	290.8	260.0	262.1	263.9		
Alimento final (F)	220.6	230.3	236.0	235.5	241.5	246.2	234.4	232.5	254.1	231.3	232.3	221.2		
Alimento ingerido (AI=I-F)	11.2	19.6	37.8	10.0	16.5	30.6	20.7	24.3	36.7	28.7	29.8	42.7		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	11.2	30.8	68.6	78.6	95.1	125.7	146.4	170.7	207.4	236.1	265.9	308.6		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>51.9 g</u> Dieta: <u>Cas + Ca 6</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	53.8	65.2	79.8	82.5	94.5	101.0	118.1	126.9	135.5	143.6	149.3	168.9		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	1.9	13.3	27.9	30.6	42.6	49.1	66.2	75.0	83.6	91.7	97.4	117.0		
Alimento inicial (I)	265.2	283.0	312.3	276.9	289.8	300.8	286.0	303.3	321.1	289.0	297.8	305.2		
Alimento final (F)	255.3	266.0	271.3	266.8	263.0	255.6	256.4	270.6	276.0	258.3	267.1	256.5		
Alimento ingerido (AI=I-F)	9.9	17.0	41.0	10.1	26.8	45.2	29.6	32.7	45.1	30.7	30.7	48.7		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	9.9	26.9	67.9	78.0	104.8	150.0	179.6	212.3	257.4	288.1	318.8	367.5		
Observaciones: _____														

LOTE 3. Dieta a base de caseína con fumarato ferroso.

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>35.8 g</u> Dieta: <u>Cas + Fe 1</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	41.5	44.9	57.0	59.0	66.0	76.1	78.8	82.0	88.3	95.8	102.0	114.5		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	5.7	9.1	21.2	23.2	30.2	40.3	43.0	46.2	52.5	60.0	66.2	78.7		
Alimento inicial (I)	269.8	289.7	326.0	296.0	304.0	321.5	297.7	299.4	333.5	306.2	303.8	303.0		
Alimento final (F)	260.7	275.3	292.9	287.8	284.1	291.8	279.0	281.0	302.3	282.1	279.9	265.3		
Alimento ingerido (AI=I-F)	9.1	14.4	33.1	8.2	19.9	29.7	18.7	18.4	31.2	24.1	23.9	37.7		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	9.1	23.5	56.6	64.8	84.7	114.4	133.1	151.5	182.7	206.8	230.7	268.4		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>36.2 g</u> Dieta: <u>Cas + Fe 2</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	41.6	46.3	57.5	60.5	66.2	74.5	81.0	85.0	89.9	94.6	100.5	108.0		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	5.4	10.1	21.3	24.3	30.0	38.3	44.8	48.8	53.7	58.4	64.3	71.8		
Alimento inicial (I)	231.6	253.1	290.8	264.7	278.9	285.4	266.1	269.1	301.4	271.1	268.3	269.0		
Alimento final (F)	222.7	240.7	260.3	256.5	260.8	258.4	243.6	250.7	270.6	249.3	246.4	234.5		
Alimento ingerido (AI=I-F)	8.9	12.4	30.5	8.2	18.1	27.0	22.5	18.4	30.8	21.8	21.8	34.5		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	8.9	21.3	51.8	60.0	78.1	105.1	127.6	146.0	176.8	198.6	220.4	254.9		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 47.5 g Dieta: Cas + Fe 3 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	49.4	59.6	72.0	74.7	79.7	86.5	91.5	99.0	110.3	118.1	125.3	138.4		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	1.9	12.1	24.5	27.2	32.2	39.0	44.0	51.5	62.8	70.6	77.8	90.9		
Alimento inicial (I)	231.9	249.5	278.8	245.6	256.9	274.3	254.0	257.0	284.6	250.6	260.4	262.3		
Alimento final (F)	220.2	229.9	240.3	235.5	234.7	244.5	232.0	233.7	243.5	223.9	232.5	221.8		
Alimento ingerido (Al=I-F)	11.7	19.6	38.5	10.1	22.2	29.8	22.0	23.3	41.1	26.7	27.9	40.5		
Alimento acumulado (Σ Al) _{día}	11.7	31.3	69.8	79.9	102.1	131.9	153.9	177.2	218.3	245.0	272.9	313.4		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 47.5 g Dieta: Cas + Fe 4 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	50.0	58.1	69.0	73.0	76.5	83.6	89.7	96.1	108.6	117.1	124.4	106.1		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	2.5	10.6	21.5	25.5	29.0	36.1	42.2	48.6	61.1	69.6	76.9	58.6		
Alimento inicial (I)	269.0	287.9	326.3	295.9	303.3	314.9	295.9	297.2	325.4	287.7	298.9	301.4		
Alimento final (F)	257.5	270.2	292.4	287.0	285.1	285.4	274.5	273.9	282.2	261.9	271.9	264.6		
Alimento ingerido (Al=I-F)	11.5	17.7	33.9	8.9	18.2	29.5	21.4	23.3	43.2	25.8	27.0	36.8		
Alimento acumulado (Σ Al) _{día}	11.5	29.2	63.1	72.0	90.2	119.7	141.1	164.4	207.6	233.4	260.4	297.2		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>50.3 g</u> Dieta: <u>Cas + Fe 5</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	54.5	62.9	78.0	82.5	87.7	99.0	101.5	105.4	115.9	120.0	127.9	141.6		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	4.2	12.6	27.7	32.2	37.4	48.7	51.2	55.1	65.6	69.7	77.6	91.3		
Alimento inicial (I)	268.4	287.1	318.2	285.4	295.3	312.0	289.1	289.1	326.8	292.4	296.6	301.3		
Alimento final (F)	257.8	268.0	278.9	275.0	273.8	276.1	267.5	266.9	287.9	272.1	269.2	258.1		
Alimento ingerido (AI=I-F)	10.6	19.1	39.3	10.4	21.5	35.9	21.6	22.2	38.9	20.3	27.4	43.2		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	10.6	29.7	69.0	79.4	100.9	136.8	158.4	180.6	219.5	239.8	267.2	310.4		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>50.5 g</u> Dieta: <u>Cas + Fe 6</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	50.6	60.2	70.0	73.5	77.8	84.3	85.5	91.0	98.7	104.5	111.6	119.3		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	0.1	9.7	19.5	23.0	27.3	33.8	35.0	40.5	48.2	54.0	61.1	68.8		
Alimento inicial (I)	232.0	250.9	285.2	258.1	268.9	289.9	271.9	274.0	300.9	270.8	269.9	283.6		
Alimento final (F)	221.1	234.2	252.6	249.8	250.6	261.7	254.0	254.6	269.9	250.2	249.8	251.2		
Alimento ingerido (AI=I-F)	10.9	16.7	32.6	8.3	18.3	28.2	17.9	19.4	31.0	20.6	20.1	32.4		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	10.9	27.6	60.2	68.5	86.8	115.0	132.9	152.3	183.3	203.9	224.0	256.4		
Observaciones: _____														

LOTE 4. Dieta a base de garbanzo

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>32.9 g</u> Dieta: <u>Ga 1</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	35.4	38.7	49.6	52.2	57.0	67.0	71.2	78.7	85.0	89.9	91.0	100.0		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	2.5	5.8	16.7	19.3	24.1	34.1	38.3	45.8	52.1	57.0	58.1	67.1		
Alimento inicial (I)	231.2	246.3	278.2	258.8	271.7	283.2	264.7	267.8	294.5	263.4	264.4	269.7		
Alimento final (F)	224.5	235.1	248.0	251.2	254.8	254.1	244.1	244.6	259.8	239.4	243.1	233.0		
Alimento ingerido (AI=I-F)	6.7	11.2	30.2	7.6	16.9	29.1	20.6	23.2	34.7	24.0	21.3	36.7		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	6.7	17.9	48.1	55.7	72.6	101.7	122.3	145.5	180.2	204.2	225.5	262.2		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>38.5 g</u> Dieta: <u>Ga 2</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	42.5	47.5	58.5	61.0	68.1	77.5	84.2	89.1	96.3	100.4	106.4	112.2		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	4.0	9.0	20.0	22.5	29.6	39.0	45.7	50.6	57.8	61.9	67.9	73.7		
Alimento inicial (I)	269.1	284.8	315.6	294.2	304.9	318.8	295.4	292.4	324.4	305.9	300.9	304.3		
Alimento final (F)	260.0	270.7	282.8	285.6	286.2	285.2	271.9	268.8	285.6	280.1	273.8	266.5		
Alimento ingerido (AI=I-F)	9.1	14.1	32.8	8.6	18.7	33.6	23.5	23.6	38.8	25.8	27.1	37.8		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	9.1	23.2	56.0	64.6	83.3	116.9	140.4	164.0	202.8	228.6	255.7	293.5		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 47.0 g Dieta: Ga 3 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal ($P_{\text{día}}$)	51.0	57.8	72.5	77.4	84.0	96.8	102.0	109.3	119.6	124.9	130.0	141.2		
Incremento acumulado ($P_{\text{día}}-P_i$)	4.0	10.8	25.5	30.4	37.0	49.8	55.0	62.3	72.6	77.9	83.0	94.2		
Alimento inicial (I)	279.8	289.3	317.8	287.6	297.2	312.9	294.3	309.2	335.3	307.8	306.9	309.5		
Alimento final (F)	268.4	272.0	276.8	276.1	272.5	273.4	269.2	282.3	292.2	280.8	279.0	269.4		
Alimento ingerido (AI=I-F)	11.4	17.3	41.0	11.5	24.7	39.5	25.1	26.9	43.1	27.0	27.9	40.1		
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}	11.4	28.7	69.7	81.2	105.9	145.4	170.5	197.4	240.5	267.5	295.4	335.5		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 48.3 g Dieta: Ga 4 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal ($P_{\text{día}}$)	53.0	59.7	70.0	72.5	77.0	82.4	89.6	97.4	104.0	108.9	111.5	119.8		
Incremento acumulado ($P_{\text{día}}-P_i$)	4.7	11.4	21.7	24.2	28.7	34.1	41.3	49.1	55.7	60.6	63.2	71.5		
Alimento inicial (I)	270.5	279.4	304.3	281.9	296.9	318.3	296.6	303.4	332.5	310.5	310.3	312.1		
Alimento final (F)	259.5	262.2	271.0	273.0	277.8	286.0	275.3	279.4	297.8	287.2	287.8	278.4		
Alimento ingerido (AI=I-F)	11.0	17.2	33.3	8.9	19.1	32.3	21.3	24.0	34.7	23.3	22.5	33.7		
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}	11.0	28.2	61.5	70.4	89.5	121.8	143.1	167.1	201.8	225.1	247.6	281.3		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>49.9 g</u> Dieta: <u>Ga 5</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	50.0	58.2	70.5	76.4	83.0	90.8	93.0	99.7	107.6	114.7	118.7	127.8		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	0.1	8.3	20.6	26.5	33.1	40.9	43.1	49.8	57.7	64.8	68.8	77.9		
Alimento inicial (I)	229.5	241.6	265.1	238.8	256.5	268.5	246.7	261.4	286.8	269.3	260.3	281.7		
Alimento final (F)	218.2	223.8	218.5	227.2	231.8	234.2	221.2	236.2	246.7	241.2	232.6	239.8		
Alimento ingerido (AI=I-F)	11.3	17.8	46.6	11.6	24.7	34.3	25.5	25.2	40.1	28.1	27.7	41.9		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	11.3	29.1	75.7	87.3	112.0	146.3	171.8	197.0	237.1	265.2	292.9	334.8		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>53.0 g</u> Dieta: <u>Ga 6</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	48.5	61.3	74.5	78.5	85.9	97.1	102.7	110.9	121.4	128.7	134.2	143.6		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	-4.5	8.3	21.5	25.5	32.9	44.1	49.7	57.9	68.4	75.7	81.2	90.6		
Alimento inicial (I)	232.7	246.5	269.2	243.6	257.8	268.4	251.2	264.3	288.9	263.0	258.7	274.8		
Alimento final (F)	222.8	225.4	223.2	231.2	231.3	229.3	222.9	235.3	246.9	235.4	230.9	233.2		
Alimento ingerido (AI=I-F)	9.9	21.1	46.0	12.4	26.5	39.1	28.3	29.0	42.0	27.6	27.8	41.6		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	9.9	31.0	77.0	89.4	115.9	155.0	183.3	212.3	254.3	281.9	309.7	351.3		
Observaciones: _____														

LOTE 5. Dieta a base de garbanzo con citrato de calcio

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>33.9 g</u> Dieta: <u>Ga + Ca 1</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	36.5	39.3	47.4	49.0	54.5	58.5	62.5	67.4	73.5	78.4	82.4	84.9		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	2.6	5.4	13.5	15.1	20.6	24.6	28.6	33.5	39.6	44.5	48.5	51.0		
Alimento inicial (I)	267.3	281.6	318.5	298.2	312.8	327.8	326.2	320.4	356.8	331.2	321.0	320.6		
Alimento final (F)	260.6	271.6	293.8	292.1	297.6	306.6	305.8	309.3	330.5	311.0	301.1	295.2		
Alimento ingerido (AI=I-F)	6.7	10.0	24.7	6.1	15.2	21.2	20.4	11.1	26.3	20.2	19.9	25.4		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	6.7	16.7	41.4	47.5	62.7	83.9	104.3	115.4	141.7	161.9	181.8	207.2		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>38.5 g</u> Dieta: <u>Ga + Ca 2</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	42.4	46.8	56.7	60.0	66.4	76.8	82.5	87.2	94.4	97.3	101.6	107.6		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	3.9	8.3	18.2	21.5	27.9	38.3	44.0	48.7	55.9	58.8	63.1	69.1		
Alimento inicial (I)	304.9	281.0	315.9	293.5	303.5	320.4	299.7	305.5	332.8	300.9	300.3	299.4		
Alimento final (F)	295.9	267.5	284.3	284.8	283.7	287.4	274.0	284.4	294.7	275.1	275.1	262.9		
Alimento ingerido (AI=I-F)	9.0	13.5	31.6	8.7	19.8	33.0	25.7	21.1	38.1	25.8	25.2	36.5		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	9.0	22.5	54.1	62.8	82.6	115.6	141.3	162.4	200.5	226.3	251.5	288.0		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 47.0 g Dieta: Ga + Ca 3 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	49.9	56.1	57.7	71.5	78.4	93.1	99.0	104.6	105.8	119.8	126.7	132.9		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	2.9	9.1	10.7	24.5	31.4	46.1	52.0	57.6	58.8	72.8	79.7	85.9		
Alimento inicial (I)	269.6	285.1	322.8	292.3	302.6	325.2	300.4	301.2	325.3	296.9	296.2	300.1		
Alimento final (F)	259.4	269.5	281.4	281.1	278.7	288.5	273.8	275.8	283.6	269.9	269.9	263.7		
Alimento ingerido (AI=I-F)	10.2	15.6	41.4	11.2	23.9	36.7	26.6	25.4	41.7	27.0	26.3	36.4		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	10.2	25.8	67.2	78.4	102.3	139.0	165.6	191.0	232.7	259.7	286.0	322.4		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata: Wistar Sexo: M Peso inicial (Pi): 48.3 g Dieta: Ga + Ca 4 Fecha: 08/Nov/10

Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	46.5	56.7	70.5	74.0	79.7	89.4	92.5	99.3	105.1	111.4	114.8	123.9		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	-1.8	8.4	22.2	25.7	31.4	41.1	44.2	51.0	56.8	63.1	66.5	75.6		
Alimento inicial (I)	231.6	244.4	277.0	244.9	254.4	266.7	252.3	260.0	283.8	256.2	262.5	266.6		
Alimento final (F)	221.3	226.7	233.7	232.9	229.2	229.2	227.0	233.5	242.8	220.4	227.6	222.5		
Alimento ingerido (AI=I-F)	10.3	17.7	43.3	12.0	25.2	37.5	25.3	26.5	41.0	35.8	34.9	44.1		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	10.3	28.0	71.3	83.3	108.5	146.0	171.3	197.8	238.8	274.6	309.5	353.6		

Observaciones: _____

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>50.0 g</u> Dieta: <u>Ga + Ca 5</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	49.0	57.8	74.2	78.7	86.7	97.5	100.0	106.3	114.5	119.3	124.7	132.2		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	-1.0	7.8	24.2	28.7	36.7	47.5	50.0	56.3	64.5	69.3	74.7	82.2		
Alimento inicial (I)	224.5	238.7	264.5	231.2	246.5	261.4	244.3	257.9	280.2	254.5	257.1	260.1		
Alimento final (F)	214.3	218.3	216.5	219.9	219.8	223.4	217.9	232.8	239.5	227.0	229.9	222.6		
Alimento ingerido (AI=I-F)	10.2	20.4	48.0	11.3	26.7	38.0	26.4	25.1	40.7	27.5	27.2	37.5		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	10.2	30.6	78.6	89.9	116.6	154.6	181.0	206.1	246.8	274.3	301.5	339.0		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>52.8 g</u> Dieta: <u>Ga + Ca 6</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	51.5	59.1	72.1	75.6	82.0	94.0	97.3	102.5	106.2	115.2	117.5	122.6		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	-1.3	6.3	19.3	22.8	29.2	41.2	44.5	49.7	53.4	62.4	64.7	69.8		
Alimento inicial (I)	274.6	287.4	318.7	286.6	302.1	312.9	295.1	302.1	328.6	310.9	302.1	308.7		
Alimento final (F)	263.2	268.6	276.2	275.5	277.8	274.5	271.7	277.5	291.3	276.2	281.1	274.0		
Alimento ingerido (AI=I-F)	11.4	18.8	42.5	11.1	24.3	38.4	23.4	24.6	37.3	34.7	21.0	34.7		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	11.4	30.2	72.7	83.8	108.1	146.5	169.9	194.5	231.8	266.5	287.5	322.2		
Observaciones: _____														

LOTE 6. Dieta a base de garbanzo con fumarato ferroso.

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>29.4 g</u> Dieta: <u>Ga + Fe 1</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	31.5	38.0	46.0	48.5	54.0	63.5	70.5	77.8	86.1	93.3	100.0	108.0		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	2.1	8.6	16.6	19.1	24.6	34.1	41.1	48.4	56.7	63.9	70.6	78.6		
Alimento inicial (I)	248.4	272.6	302.4	282.4	285.9	294.6	286.5	275.9	306.7	281.8	278.9	293.0		
Alimento final (F)	242.1	260.7	276.1	275.6	268.8	266.5	265.8	253.5	270.1	255.9	252.4	254.2		
Alimento ingerido (AI=I-F)	6.3	11.9	26.3	6.8	17.1	28.1	20.7	22.4	36.6	25.9	26.5	38.8		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	6.3	18.2	44.5	51.3	68.4	96.5	117.2	139.6	176.2	202.1	228.6	267.4		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>39.3 g</u> Dieta: <u>Ga + Fe 2</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	42.8	49.1	60.0	63.5	71.0	86.5	90.8	98.2	106.6	112.6	118.9	126.2		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	3.5	9.8	20.7	24.2	31.7	47.2	51.5	58.9	67.3	73.3	79.6	86.9		
Alimento inicial (I)	269.9	291.6	313.7	287.7	288.1	307.9	291.8	295.8	310.3	295.4	290.0	301.3		
Alimento final (F)	261.4	278.3	282.2	276.8	265.3	271.2	266.6	269.6	269.3	266.6	261.4	259.8		
Alimento ingerido (AI=I-F)	8.5	13.3	31.5	10.9	22.8	36.7	25.2	26.2	41.0	28.8	28.6	41.5		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	8.5	21.8	53.3	64.2	87.0	123.7	148.9	175.1	216.1	244.9	273.5	315.0		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>45.8 g</u> Dieta: <u>Ga + Fe 3</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	50.0	57.2	76.0	79.0	87.0	95.8	97.5	106.1	114.8	123.4	126.0	130.0		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	4.2	11.4	30.2	33.2	41.2	50.0	51.7	60.3	69.0	77.6	80.2	84.2		
Alimento inicial (I)	284.7	303.0	324.0	288.9	302.6	316.2	297.7	305.5	330.4	308.6	299.6	313.4		
Alimento final (F)	272.9	284.6	278.4	277.5	276.1	277.0	273.7	275.6	287.8	276.8	273.6	273.1		
Alimento ingerido (AI=I-F)	11.8	18.4	45.6	11.4	26.5	39.2	24.0	29.9	42.6	31.8	26.0	40.3		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	11.8	30.2	75.8	87.2	113.7	152.9	176.9	206.8	249.4	281.2	307.2	347.5		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>48.5 g</u> Dieta: <u>Ga + Fe 4</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	50.0	61.2	77.5	78.5	85.5	95.0	97.0	101.5	87.0	106.3	111.6	124.3		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	1.5	12.7	29.0	30.0	37.0	46.5	48.5	53.0	38.5	57.8	63.1	75.8		
Alimento inicial (I)	275.5	292.8	312.2	276.7	296.7	310.6	290.3	298.4	323.0	318.0	316.2	318.6		
Alimento final (F)	262.9	271.2	266.8	265.8	270.8	270.6	266.4	273.9	302.5	292.5	291.1	279.5		
Alimento ingerido (AI=I-F)	12.6	21.6	45.4	10.9	25.9	40.0	23.9	24.5	20.5	25.5	25.1	39.1		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	12.6	34.2	79.6	90.5	116.4	156.4	180.3	204.8	225.3	250.8	275.9	315.0		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>49.2 g</u> Dieta: <u>Ga + Fe 5</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	52.4	61.6	75.6	78.3	81.5	89.6	95.1	99.4	107.4	112.7	117.4	122.1		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	3.2	12.4	26.4	29.1	32.3	40.4	45.9	50.2	58.2	63.5	68.2	72.9		
Alimento inicial (I)	286.2	302.9	322.3	287.9	309.1	327.5	313.0	313.8	340.5	325.1	320.5	327.3		
Alimento final (F)	272.7	282.0	277.5	276.7	287.0	292.8	287.8	289.1	302.2	299.4	295.8	290.0		
Alimento ingerido (AI=I-F)	13.5	20.9	44.8	11.2	22.1	34.7	25.2	24.7	38.3	25.7	24.7	37.3		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	13.5	34.4	79.2	90.4	112.5	147.2	172.4	197.1	235.4	261.1	285.8	323.1		
Observaciones: _____														

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL														
Rata: <u>Wistar</u> Sexo: <u>M</u> Peso inicial (Pi): <u>54.5 g</u> Dieta: <u>Ga + Fe 6</u> Fecha: <u>08/Nov/10</u>														
Tiempo (días)	2	4	9	10	12	15	17	19	22	24	26	28		
Peso animal (P _{día})	55.3	64.9	80.7	86.5	93.0	104.0	109.5	114.5	124.2	130.2	138.4	146.4		
Incremento acumulado (P _{día} -Pi)	0.8	10.4	26.2	32.0	38.5	49.5	55.0	60.0	69.7	75.7	83.9	91.9		
Alimento inicial (I)	242.1	259.2	305.0	268.2	275.6	286.1	261.5	270.8	292.7	275.7	276.7	300.0		
Alimento final (F)	228.4	237.4	263.2	253.1	246.3	241.4	232.4	242.0	247.1	242.7	240.8	256.4		
Alimento ingerido (AI=I-F)	13.7	21.8	41.8	15.1	29.3	44.7	29.1	28.8	45.6	33.0	35.9	43.6		
Alimento acumulado (Σ AI) _{día}	13.7	35.5	77.3	92.4	121.7	166.4	195.5	224.3	269.9	302.9	338.8	382.4		
Observaciones: _____														

7.4 Elaboración de dietas.

Ejemplo de cálculos para la elaboración de la dieta de garbanzo.

Tabla 1. Dieta de referencia (caseína)

Ingredientes	g/100 g de dieta
Caseína (85.16 % de proteína)	11.74
Sacarosa	22.0
Glucosa	19.0
Dextrina	25.0
Manteca vegetal	8.0
Aceite de maíz o cártamo	6.0
Mezcla de sales	2.0
Mezcla de vitaminas	1.0
Colina (solución al 50%)	0.4
Celulosa comercial	4.86
Total	100.0

Para elaborar la dieta de garbanzo es necesario contar con el análisis proximal de la leguminosa que se muestra a continuación:

Tabla 2. Análisis proximal de la harina de garbanzo

Componentes	g/100 g de muestra
Humedad (Pérdida por secado)	4.56
Proteína (%N X 6.25)	20.84
Grasa (extracto etéreo)	5.25
Cenizas (550°C)	3.05
Fibra cruda	2.07
Hidratos de carbono (por diferencia)	62.72
Total	100.0

Como la dieta debe ser isoproteínica con respecto a la de referencia se calcula a 10% de proteína:

$$\begin{array}{l} 20.84 \text{ g proteína vegetal} \text{ -----} 100\text{g muestra} \\ 10 \text{ g de proteína vegetal} \text{ -----} X \\ X=47.98 \text{ g de muestra} \end{array}$$

En 47.98 de muestra se tienen 10 g de proteína de la fuente a estudiar, pero a su vez dicha cantidad proporciona lo siguiente:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ g de muestra} \text{ -----} 5.25 \text{ g lípidos} \\ 47.98 \text{ g de muestra} \text{ -----} X \\ X= 2.52 \text{ g de lípidos} \end{array}$$

De igual manera se calcula el contenido de hidratos de carbono digeribles, cenizas, fibra cruda y humedad:

Proteína		= 10 g
Lípidos (grasa)	= 47.98 X 0.0525	= 2.52 g
Hidratos de carbono digeribles	= 47.98 X 0.0627	= 30.82 g
Cenizas (minerales)	= 47.98 X 0.0305	= 1.46 g
Fibra (celulosa)	= 47.98 X 0.0207	= 0.99 g
Humedad	= 47.98 X 0.0456	= 2.19 g
	<hr/>	
Total		47.98 g

Ya que la dieta de referencia tiene una densidad energética de 18.0 kJ/g se tiene que ajustar el contenido energético de la dieta de estudio de la siguiente manera:

Es necesario calcular las proporciones de cada uno de los ingredientes que aportan hidratos de carbono en la dieta de referencia.

Los 66 g (100%) de hidratos de carbono totales provienen de:

Ingrediente	g	Cálculo	Relación en %
Sacarosa	22	$(22 \times 100) / 66$	33.33
Glucosa	19	$(19 \times 100) / 66$	28.79
Dextrina	25	$(25 \times 100) / 66$	37.88

Igualmente se calculan las proporciones para los lípidos considerando 14 g como total:

Ingrediente	g	Cálculo	Relación en %
Manteca	8.0	$(8 \times 100) / 14$	57.14
Aceite de maíz	6.0	$(6 \times 100) / 14$	42.86

Una vez que se conocen las proporciones en las que se encuentran tanto los hidratos de carbono como los lípidos en la dieta de referencia, la dieta de estudio se ajusta de la siguiente forma:

Hidratos de carbono:

La fuente de proteína aporta 30.82 g de hidratos de carbono, entonces se calcula cuánto se debe adicionar para completar los 66 g que se requiere para que se mantenga isoenergética la dieta con respecto a la de referencia.

$66 \text{ g} - 30.82 \text{ g} = 35.18 \text{ g}$ de hidratos de carbono que se tienen que adicionar.

Ingrediente	Cálculo	Cantidad a adicionar (g)
Sacarosa	$(35.18 \times 33.33) / 100$	11.72
Glucosa	$(35.18 \times 28.79) / 100$	10.13
Dextrina	$(35.18 \times 37.88) / 100$	13.13
	Total	35.18

Se procede de igual forma para ajustar el contenido de lípidos:

14.0 g – 2.52 g = 11.48 g de lípidos que se tienen que adicionar a la fuente de proteína.

Ingrediente	Cálculo	Cantidad a adicionar (g)
Manteca	$(11.48 \times 57.14) / 100$	6.56
Aceite	$(11.48 \times 42.86) / 100$	4.92
	Total	11.48

Una vez ajustados el contenido de proteína, hidratos de carbono y lípidos en la dieta se ajusta el contenido de minerales:

2 g (referencia) – 1.46 g (fuente de proteína) = 0.54 g de minerales a adicionar.

La cantidad de vitaminas y colina se adicionan como se indica en la dieta de referencia. Con respecto al ajuste de celulosa se debe mencionar que al no considerarse la humedad en las dietas, habrá una pequeña discrepancia entre las dietas, por lo que se usa a la celulosa para ajustar la formulación de la siguiente manera:

Celulosa adicional = $100 - \Sigma$ (proteína, hidratos de carbono, lípidos, minerales, vitaminas y colina)

Tabla 4. Formulación final de la dieta experimental de garbanzo

Ingredientes	g/100 g de dieta
Fuente de proteína (garbanzo)	47.98
Sacarosa	11.72
Glucosa	10.13
Dextrina	13.33
Manteca vegetal	6.56
Aceite de maíz	4.92
Mezcla de sales	0.54
Mezcla de vitaminas	1.00
Colina (solución al 50%)	0.4
Σ	96.58
Celulosa (Cantidad para reajustar a 100 g)	3.42

7.5 Valores utilizados en el cálculo del balance de hierro y calcio

Tabla 5. Valores utilizados para las dietas de caseína.

Dietas	Pool de ratas	Alimento Ingerido (g)	Heces (g)	Fe ingerido (mg)	Fe en heces (mg)	Ca ingerido (g)	Ca en Heces (g)
caseína	1,2 y 3	364.90	24.10	14.80	3.356	0.803	0.205
	4,5 y 6	500.50	28.70	20.30	4.133	1.101	0.263
Caseína + CCa	1,2 y 3	357.0	27.20	14.0	3.390	1.232	0.380
	4,5 y 6	424.10	35.70	17.0	4.320	1.463	0.514
Caseína + FFe	1,2 y 3	362.0	16.30	112.0	66.070	0.800	0.112
	4,5 y 6	366.70	14.40	114.0	57.370	0.807	0.111

Tabla 6. Valores utilizados para las dietas de garbanzo.

Dietas	Pool de ratas	Alimento Ingerido (g)	Heces (g)	Fe ingerido (mg)	Fe en heces (mg)	Ca ingerido (g)	Ca en Heces (g)
Garbanzo	1,2 y 3	384.3	27.1	18.0	6.920	0.461	0.034
	4,5 y 6	391.0	26.8	18.0	7.030	0.470	0.037
Garbanzo + CCa	1,2 y 3	348.8	23.5	17.0	6.0	0.719	0.095
	4,5 y 6	416.4	27.8	20.0	7.040	0.858	0.159
Garbanzo + FFe	1,2 y 3	408.4	20.1	127.0	69.960	0.490	0.029
	4,5 y 6	349.3	19.3	123.0	67.570	0.473	0.035