

**Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Rosario**

**TESIS DOCTORAL**

**Estudios de la biodisponibilidad de calcio y evaluación  
sensorial de una bebida desarrollada en base a jugos  
de frutas, kéfir y cáscara de huevo**

**María Eugenia Chulibert**

**Director: Dr. Alfredo Rigalli**

**Codirectora: Dra. Silvana Sandra Ramadán**

**Colaboración: Dra. Cecilia Casabonne**

*A mis padres y al par más grande que me dieron, vos **SERE***

*A cada **SER** que me ayudó a que esto sea posible*

*A la **VIDA** por haberme dado la oportunidad de abrirme a pensar*

## **Agradecimientos**

Agradezco a las instituciones CONICET y a la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, por permitirme acceder a la realización de un doctorado.

Agradezco enormemente al Dr. Rigalli Alfredo, a mi maestro, quién me captó y me ofreció esta gran oportunidad. Por su infinita paciencia y por enseñarme desde el gran científico y ser humano que es. Le agradezco por sus consejos sobre la vida y por acompañarme en mi propio vuelo. Le estaré agradecida toda mi vida y lo llamaré siempre que R no me funcione y para compartir ciencia. Gracias Rigalli por haberme abierto las puertas del mundo científico.

Agradezco a la Dra. Silvana Ramadán por haber aceptado ser mi codirectora, por haberme abierto al mundo microscópico y haberme enseñado que la ciencia es una aproximación a la realidad. Por haberme guiado en mi doctorado, ayudado a enfocarme y darle un fin a mi tesis.

Agradezco a la Dra. Cecilia Casabonne por haber tenido toda la paciencia para que aprenda a plaquear, a estriar, por cada detalle corregido. Con vos completamos el equipo de trabajo.

A mis tres maestros les doy mis gracias y sepan que marcaron mi vida, abrieron mi mente y son los hombros sobre los que a partir de hoy me paro. Les digo: Muchas gracias, por y para siempre.

A mis compañeros Patricia Lupión, Mercedes Lombarte, Lucas Brun, Verónica Di Loreto, Maela Lupo y Brenda Fina porque me abrieron las puertas del lab y no se imaginan lo feliz que allí fui. Amé cada día que compartimos juntos. Gracias por entender mis miedos, mis inseguridades y mi intensidad. Gracias por haber sido parte de mis inicios, haberme ayudado en tantas cosas y por haber confiado en mi.

A todos los miembros del LBO y CUEM, a quienes me ayudaron, a mis becarios, a cada uno le digo Muchas Gracias. Mi tesis no podría haberse realizado sin la colaboración de todos ustedes. Gracias de verdad por todo el apoyo brindado.

A mis docentes de cursos del doctorado, por contribuir a mi formación académica, por interpelar mis ideas, por enseñarme a pensar.

A mis compañeros del doctorado por haber sido testigo de mi tesis, por haberme escuchado y ayudado. Le agradezco a Yanina Sguasero por responder mis dudas y haberme aconsejado cuando lo necesité. A Guillermo Tejada por darme el empujón que necesitaba para empezar a escribir la tesis. A Patricia Lupión y Carla Tomatis, por haber transitado esta etapa juntas, por el apoyo que nos dimos.

A Laureana Villarruel, por tu ayuda con la química, los cálculos estequiométricos y por nuestra amistad. A Alejo Ferrer por tantas charlas en el lab, por tu escucha, por tus ideas científicas, por los proyectos compartidos.

A Mercedes Lombarte por estar ahí, al lado mio siempre. Por haber hecho tantas cosas para que encuentre un lugar en la ciencia. Por la amistad que construimos.

A Emilce Llopart y Nora Aimaretti por haber confiado en mi y haber contribuido en mi formación.

A los investigadores Francisco Dillon, Soledad Caballero, Gabriel Vinderola y Luca Settanni, por haberse tomado el tiempo para responder mis dudas.

A Nicolás Rigalli, por ayudarme con la informática, haber salvado mi pc casi al final del doctorado y haber respondido todas mis consultas.

A mis compañeros investigadores de cursos, congresos, jornadas, seminarios, colegas, a cada persona que contribuyó en mi formación académica y me hizo alguna devolución para mejorar mi proyecto de tesis.

A mis amigos, TODOS, por ser mi sostén, por haberme acompañado en todo esta etapa y pido disculpas si fui muy densa con la tesis. Sin ustedes todo esto no tendría sentido. Gracias por ser parte de esto que es tan importante para mi. Porque algo se convierte en un logro cuando lo comparto con mis seres queridos. Gracias por estar siempre.

Agradezco a Paola Radice por darme el impulso cuando caí y por no cansarse de decirme que puedo. Gracias por darme la fuerza para perseguir mis sueños y para no resignarme antes de la recompensa.

Agradezco:

A mi mamá, por haberme enseñado el valor más grande de la vida: ser buena persona.

A mi papá, por haberme enseñado a luchar por lo que quiero.

A mi tías Norma y Elsa, por el sostén y acompañamiento de siempre.

A mi hermana, mi par, por siempre estar en cada detalle, por ser INCONDICIONAL. Por haber sido testigo de toda esta etapa. Por ser la persona que más escuchó la palabra "tesis", por entender mis frustraciones, por ayudarme, por alentarme a seguir. Gracias por estar y ser parte.

A Kévin, por acompañarme en este último tramo, por tu sostén y por ser parte de mi crecimiento personal.

## Índice

Resumen.....	1
Publicaciones.....	2
Abreviatura.....	4
1 Introducción.....	6
1.1 Motivación.....	6
1.2 Antecedentes.....	11
1.2.1 Nutrición.....	11
1.2.2 Calcio.....	12
1.2.2.1 Generalidades del calcio.....	12
1.2.2.2 Requerimientos nutricionales de calcio.....	13
1.2.2.3 Fuentes dietarias de calcio.....	14
1.2.2.4 Absorción intestinal de calcio.....	18
1.2.2.4.1 Vía transcelular.....	19
1.2.2.4.2 Vía paracelular.....	20
1.2.2.4.3 Factores condicionantes de la absorción del calcio.....	21
1.2.2.5 Regulación metabólica del calcio.....	25
1.2.2.5.1 Parathormona.....	25
1.2.2.5.2 Calcitonina.....	27
1.2.2.5.3 Vitamina D.....	27
1.2.2.6 Patologías relacionadas a la ingesta y metabolismo del calcio.....	28
1.2.2.7 Evaluación del calcio a nivel poblacional.....	33
1.2.2.8 Toxicidad.....	34
1.2.2.9 Déficit de calcio.....	34
1.2.3 Estrategias para aumentar la ingesta de nutrientes.....	35
1.2.3.1 Alimentos enriquecidos.....	35
1.2.3.2 Alimentos fortificados.....	36
1.2.3.3 Suplementos dietarios.....	37
1.2.4 Experiencia en fortificación con calcio.....	38
1.2.5 Componentes de la bebida.....	39
1.2.5.1 Cáscara de huevo de gallina.....	39
1.2.5.2 Alimentos fermentados: kéfir.....	41
1.2.5.3 Frutas cítricas.....	45
2 Objetivos.....	47
3 Materiales y métodos.....	48
3.1 Objetivo 1. Estandarizar el mecanismo de preparación de una bebida en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo.....	48
3.1.1 Selección de frutas.....	48
3.1.2 Optimización de preparación de la bebida.....	48
3.1.3 Origen de los materiales.....	48
3.1.3.1 Ensayo 1.....	49
3.1.3.2 Ensayo 2.....	50
3.1.3.3 Ensayo 3.....	50
3.1.4 Mediciones realizadas.....	50
3.1.4.1 Medición de Ca.....	51
3.1.4.2 Medición de hidratos de carbono.....	51
3.1.4.3 Medición de pH.....	51
3.1.4.4 Medición de conductividad eléctrica.....	52
3.1.4.5 Medición de acidez titulable.....	52
3.1.5 Análisis estadístico.....	52
3.2 Objetivo 2. Determinar la biodisponibilidad de calcio de la bebida estandarizada.....	53
3.2.1 Absorción intestinal de calcio.....	53
3.2.1.1 Preparación de sacos intestinales evertidos.....	53
3.2.1.2 Análisis estadístico.....	55
3.3 Objetivo 3. Evaluar el efecto de la bebida sobre el esmalte dental.....	56
3.3.1 Análisis cuantitativo.....	57

3.3.2	Análisis cualitativo.....	58
3.3.3	Análisis estadístico.....	58
3.4	Objetivo 4. Evaluar la calidad microbiológica de la bebida.....	59
3.4.1	Ensayos microbiológicos.....	59
3.4.1.1	Muestra.....	59
3.4.1.2	Preparación de diluciones.....	59
3.4.1.3	Método de screening: búsqueda de microorganismos.....	60
3.4.2	Ensayos micológicos.....	60
3.4.2.1	Recuento de hongos filamentosos y levaduriformes.....	60
3.4.2.1.1	Microscopía óptica.....	61
3.4.2.2	Identificación presuntiva de levaduras.....	61
3.4.2.3	Búsqueda de clamidoconidias.....	62
3.4.2.4	Identificación definitiva de levaduras.....	63
3.4.3	Ensayos bacteriológicos.....	64
3.4.3.1	Recuento de mesófilos aerobios viables.....	64
3.4.3.2	Recuento de bacterias coliformes totales.....	64
3.4.3.3	Recuento de bacterias coliformes fecales.....	64
3.4.3.4	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva.....	65
3.4.3.5	Búsqueda de <i>Salmonella</i> spp.....	65
3.4.3.6	Búsqueda de BAL.....	66
3.4.3.6.1	Determinación fenotípica de actividad hemolítica.....	66
3.4.3.6.2	Identificación de BAL.....	67
3.5	Objetivo 5. Evaluar la aceptabilidad de consumo de la bebida en seres humanos.....	68
3.5.1	Test sensorial de escala hedónica.....	68
3.5.2	Prueba descriptiva.....	69
3.5.3	Análisis estadístico.....	70
3.6	Objetivo 6. Evaluar y describir el perfil de los consumidores de kéfir.....	71
3.6.1	Diseño metodológico.....	71
3.6.2	Análisis estadístico.....	71
4	Resultados.....	73
4.1	Objetivo 1. Estandarizar el mecanismo de preparación de una bebida en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo.....	73
4.1.1	Selección de fruta.....	73
4.1.2	Optimización de la preparación de la bebida.....	74
4.1.2.1	Ensayo 1.....	74
4.1.2.2	Ensayo 2.....	79
4.1.3	Formulación final de la bebida.....	80
4.1.3.1	Ensayo 3.....	82
4.2	Objetivo 2. Determinar la biodisponibilidad de calcio de la bebida estandarizada.....	84
4.2.1	Absorción intestinal de calcio.....	84
4.3	Objetivo 3. Evaluar el efecto de la bebida sobre el esmalte dental.....	85
4.3.1	Análisis cuantitativo.....	85
4.3.2	Análisis cualitativo.....	86
4.4	Objetivo 4. Evaluar la calidad microbiológica de la bebida.....	88
4.4.1	Ensayos microbiológicos.....	88
4.4.1.1	Método de screening: búsqueda de microorganismos.....	88
4.4.2	Ensayos micológicos.....	89
4.4.2.1	Recuento de hongos filamentosos y levaduriformes.....	89
4.4.2.2	Identificación presuntiva de levaduras.....	90
4.4.2.3	Búsqueda de clamidoconidias.....	91
4.4.2.4	Identificación definitiva de levaduras.....	92
4.4.3	Ensayo bacteriológico.....	92
4.4.3.1	Recuento de mesófilos aerobios viables.....	92
4.4.3.2	Recuento de bacterias coliformes totales.....	93
4.4.3.3	Determinación de coliformes fecales.....	93
4.4.3.4	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva.....	94
4.4.3.4.1	Confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva.....	95

4.4.3.5 Búsqueda de <i>Salmonella</i> .....	97
4.4.3.6 Recuento de BAL.....	97
4.4.3.6.1 Determinación fenotípica de actividad hemolítica.....	98
4.4.3.6.2 Identificación de BAL.....	99
4.4.3.6.3 <i>Caracterización e identificación de aislamientos</i> .....	100
4.5 Objetivo 5. Evaluar la aceptabilidad de consumo de la bebida en seres humanos.....	101
4.6 Objetivo 6. Evaluar y describir el perfil de los consumidores de kéfir.....	105
4.6.1 Análisis descriptivo.....	105
4.6.1.1 Análisis descriptivo sociodemográfico.....	105
4.6.2 Análisis descriptivo del tipo de consumidores.....	105
4.6.3 Análisis descriptivo de los individuos consumidores de kéfir.....	106
4.6.4 Análisis descriptivo de los individuos no consumidores de kéfir.....	108
4.7 Análisis cualitativo.....	109
4.8 Análisis cuantitativo.....	111
5 Discusión.....	112
6 Conclusiones.....	118
7 Bibliografía.....	120
8 Anexos.....	130
8.1 Control de calidad de agua potable.....	130
8.2 Medios de cultivo.....	131
8.3 Tinción Gram-Nicolle.....	136
8.4 Pruebas bioquímicas.....	137
8.4.1 Catalasa.....	137
8.4.2 Citocromo oxidasa.....	137
8.4.3 Prueba en agar DNasa.....	137
8.5 Consentimiento informado.....	139

## Resumen

La ingesta de calcio (Ca), o de alimentos lácteos en general, es menor a la recomendada en gran parte de la población por diferentes razones (acceso, preferencia, tolerancia digestiva). Se desarrolló una bebida con aporte de Ca, a la que haremos referencia a lo largo de toda la tesis como BEBIDA, a base de cáscara de huevo, frutas cítricas y kéfir, para ofrecer una fuente alternativa de Ca. La mayor concentración de Ca se obtuvo incubando a 20 °C y durante 72 h: 6 g de cáscara de huevo, 10 g de kéfir, 200 mL de jugo de naranja y 800 mL de agua. Con estas condiciones, la BEBIDA aporta en promedio 180 mg Ca/porción. La BEBIDA también se evaluó microbiológicamente para descartar la presencia de microorganismos patógenos. Además, experimentos realizados con saco del intestino delgado evertido en ratas demostraron que la absorción intestinal de Ca de la BEBIDA fue mayor que las soluciones controles. Finalmente, a pesar de tener un valor de pH ácido, la BEBIDA no demostró tener efecto desmineralizante sobre el esmalte dental. Esta tesis aporta una metodología para preparar a nivel doméstico un producto que podría contribuir a incrementar la ingesta diaria de Ca.

## Publicaciones

### *Artículos de revista*

Chulibert ME, Casabonne C, Ramadán S, Rigalli A. Evaluación y descripción del perfil de los consumidores de kéfir. Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. 2021.

Chulibert ME, Ferrer A, Koch KE, Rigalli A. Effect of fermented milk with kefir grains on the in vitro demineralization of bovine tooth enamel. Actual. Osteol 2019; 15(3): 205-213. ISSN 1669-8975.

### *Exposiciones orales*

Disertante en el simposio: "Prebióticos y probióticos, su impacto en la salud humana y animal". Nombre de la exposición: "Probióticos: un desafío para el mercado alimentario". XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Mendoza, Argentina. 2018.

Participación en calidad de colaborador invitado de la Mesa Redonda "Hidratándonos saludablemente". XXX Congreso Científico Argentino de Estudiantes de Medicina. 2019.

### *Pósters*

Chulibert ME, Ferrer A, Rigalli A. Desarrollo de un producto lácteo fermentado con kéfir y sus variantes. Participación en el VIII Concurso Estudiantil de Alimentos Innovadores Rosario. 2017.

Chulibert ME, Rigalli A. Estudios de biodisponibilidad, tolerancia y aceptabilidad de un alimento probiótico desarrollado en base a jugos de frutas y cáscara de huevo. Su influencia sobre los mecanismos moleculares de absorción de calcio. Participación en la XV Jornada de Jóvenes Investigadores, Asociación de Universidades Grupo Montevideo. 2017.

Chulibert ME, Piñón C, Rigalli A. Elaboración de un alimento fortificado en calcio a base de jugos de frutas. XI Jornada de Ciencia y Tecnología. Divulgación de la

Producción Científica y Tecnológica de la UNR. Rosario. 2017.

Chulibert ME; Casabonne C; Ramadán SS; Rigalli A. Descripción microbiológica de una bebida a base de jugo de naranja, kéfir y cáscara de huevo. XII Jornada de Ciencia y Técnica. Divulgación de la Producción Científica y Tecnológica de la UNR. Rosario. 2018.

Chulibert ME; Casabonne C; Ramadán SS; Rigalli A. Caracterización química y microbiológica de una bebida enriquecida en calcio y su efecto sobre el esmalte dental. XX Congreso de la Sociedad de Biología de Rosario. Obtención de Premio al Área Biomédica. 2018.

Chulibert ME; Casabonne C; Ramadán SS; Rigalli A. Comparación cualitativa microbiológica de kéfirs de distinto origen. XXI Congreso, XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Rosario. Rosario. 2019.

Chulibert ME; Andrade T; Del Ponte A; Casabonne C; Ramadán SS; Rigalli A. Evaluación de la absorción intestinal de calcio a partir de una bebida con alto contenido de este ion. XXI Congreso, XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Rosario. Rosario. 2019.

Chulibert ME; Ramadán SS; Rigalli A. Evaluación del consumo y descripción de los consumidores de kéfir. XXII Congreso, XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Rosario. Rosario. 2020.

Chulibert ME; Ramadán SS; Rigalli A. Evaluación y descripción del perfil de los consumidores de kéfir. IV Jornadas de Investigadores en Formación. Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. 2021.

## Abreviatura

AL	Agar Leche
APC	Agar Plate Count
ASC	Agar Sangre de Carnero
AVRB-L	Agar Violeta Rojo Bilis Lactosa
BAL	Bacterias ácido lácticas
BP	Agar Baird Parker
Ca	Calcio
CAA	Código Alimentario Argentino
CPP	Fosfopéptidos de Caseína
CT	Calcitonina
DMO	Densidad Mineral Ósea
DS	Desvío Estándar
ENNyS	Encuesta Nacional de Nutrición y Salud
FOS	Fructooligosacáridos
GAPA	Guías Alimentarias para la Población Argentina
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
LAP	Leucina aminopeptidasa
MCA	Análisis de las Correspondencias Múltiples
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Análisis de las Componentes Principales
PTH	Parathormona
PYR	Pirrolidónilarilamidasa
R	Razón de desmineralización
RV	Caldo Rappaport-Vassiliadis
SG	Sabouraud Glucosa
SS	Agar Salmonella Shigella

## **Abreviatura**

---

TT	Caldo Tetracionato
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
VB	Agar Verde Brillante
XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

# 1 Introducción

## 1.1 Motivación

El calcio (Ca) es un componente esencial del cuerpo humano y crítico para la salud. Este elemento participa en diversos procesos biológicos, tales como: conducción nerviosa, contracción muscular, estructura ósea, transducción de señales y regulación de la secreción hormonal y de las actividades vasculares [1]. Además, una ingesta adecuada de Ca en la dieta se ha asociado con la reducción de hipertensión [2], la prevención de preeclampsia [3], disminución de los cálculos renales y del índice de masa corporal, menor resistencia a la insulina y disminución del cáncer colorrectal en la población en general [4].

Según la Academia Nacional de Medicina de Estados Unidos y las Guías Alimentarias para la población Argentina (GAPA), la ingesta diaria recomendada (IDR) de Ca para un adulto es 1000 mg, siendo mayor en períodos de crecimiento y posmenopausia [5].

Los productos lácteos contienen Ca en alta proporción y su biodisponibilidad es elevada, favorecida por la presencia de carbohidratos [6], proteínas de la leche [7] y péptidos generados durante la digestión [1,8]. Por estas razones, se recomienda el consumo diario de tres porciones lácteas [5,9]. Por el contrario, los alimentos de origen vegetal contienen Ca pero la coexistencia con otros compuestos, especialmente el ácido oxálico, le confieren baja biodisponibilidad [10]. En prevención de la osteoporosis, además del consumo de productos lácteos, se encuentran disponibles suplementos de Ca para compensar la deficiencia en la ingesta de este micronutriente [11].

Las fuentes más importantes de Ca son los productos lácteos que constituyen

más del 60% de la ingesta diaria [12]. En los países desarrollados la ingesta de productos lácteos representa el 14% de la ingesta calórica, mientras que en los países en desarrollo el 4% [13]. En China, las principales fuentes alimentarias de Ca dietético provienen de verduras, frijoles y cereales, que representan el 30.2%, 16.7% y 14.6%, respectivamente y, los productos lácteos representan el 6.7% [14].

Una desventaja adicional de los lácteos como fuente de Ca es la presencia de intolerancia a la lactosa, enfermedad asociada a un déficit de lactasa que degrada la lactosa en glucosa y galactosa [15,16]. El déficit de dicha enzima conduce a que las personas reduzcan la ingesta de lácteos, muchas veces por autodiagnóstico de la enfermedad [17]. Además, el número de consumidores que siguen una dieta vegetariana ha aumentado notablemente en muchos países industrializados y es probable que su influencia en el sector alimentario continúe creciendo. Y, por último, la canasta básica de alimentos para un hogar de 3 integrantes representa el 87% del sueldo mínimo en Argentina [18].

Según un estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2005, en la mayoría de los países en desarrollo, la IDR de Ca de mujeres embarazadas está muy por debajo de las recomendaciones. También se han observado ingestas bajas en adolescentes de países de altos ingresos [19].

En una revisión sistemática se analizaron 150 países y se halló que la ingesta diaria promedio de Ca es de alrededor de 400 mg/día. Se observaron valores más bajos en los países de África subsahariana y en el sudeste asiático, con cifras de aproximadamente 200 mg/día. En los países de ingresos altos, la ingesta diaria de Ca fue de 600 a 800 mg/día [20].

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENNyS) del año 2005 halló que la ingesta de Ca es insuficiente en el 94% de la población, sin discriminar su localización

geográfica, situación económica o edad, con un consumo promedio de 446 mg/día en mujeres embarazadas y 367 mg/día en mujeres entre 19 y 49 años. Aun comparando la ingesta real con las metas propuestas por las GAPA, que recomiendan una ingesta mínima de 800 mg/día, más del 95% de las mujeres no llegó a consumir esa cantidad, (Figura 1) [21]. Por otra parte, se evidenció una mediana de ingesta de 482 mg/día para niñas entre 10 y 19 años, siendo la IDR para este grupo poblacional de 1300 mg Ca/día. Además, menos del 1% de la población a la cual se le indicó la toma de suplementos de Ca cumplió dicho tratamiento [5].

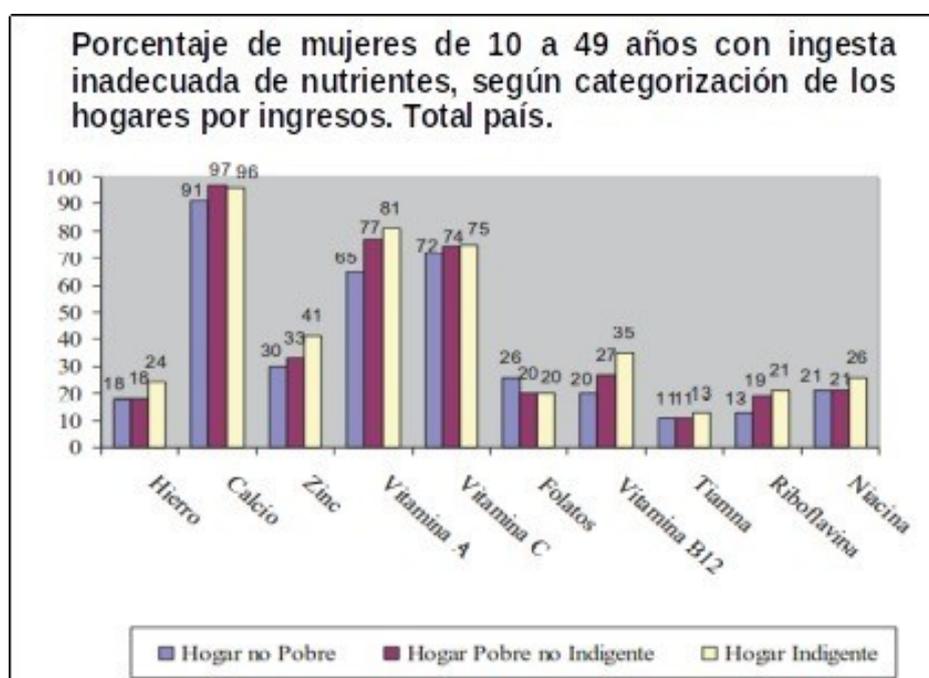


Figura 1. El 97.96% de mujeres de 10 a 49 años tienen una ingesta inadecuada de Ca. Adaptada de (5).

Frente a la problemática de déficit nutricionales, la fortificación se ha utilizado en países de altos ingresos desde hace más de 80 años para restaurar los micronutrientes perdidos durante el procesamiento de los alimentos. Además, la fortificación de alimentos tiene la ventaja de poder incorporar nutrientes a grandes segmentos de la población sin requerir cambios radicales en los patrones alimentarios. Sin embargo, a pesar de esta vasta experiencia, los alimentos fortificados no siempre

son accesibles para los grupos socioeconómicos bajos [22].

Dada la importancia del Ca para el organismo y sabiendo que es reducida la cantidad de individuos que alcanzan su IDR por distintos motivos, se propone el desarrollo de una bebida sin lactosa fuente de Ca a base de kéfir, jugos de fruta y cáscara de huevo.

### ***Problema***

Los productos lácteos son la principal fuente de Ca pero la baja ingesta de los mismos, por diversos motivos, conlleva a un déficit de Ca en la alimentación. El desarrollo de alternativas alimenticias fuentes de Ca que eviten las consecuencias de su bajo consumo, contribuirá a mantener una ingesta adecuada a lo largo de la vida.

La estandarización de una bebida en base a jugo de frutas cítricas, cáscara de huevo y kéfir se ha pensado como una fuente alternativa de Ca, de preparación doméstica y económica.

### ***Hipótesis***

La fermentación de los componentes de frutas cítricas por los microorganismos del kéfir acidifica el medio, el cual favorece la disolución del carbonato de Ca presente en la cáscara de huevo, permitiendo generar una bebida fuente de Ca no láctea.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Nutrición

Según la OMS, *“nutrición es la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo. Una buena nutrición, (una dieta suficiente y equilibrada combinada con el ejercicio físico regular) es un elemento fundamental de la buena salud. Una mala nutrición puede reducir la inmunidad, aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades, alterar el desarrollo físico y mental, y reducir la productividad”* [23].

Pedro Escudero fue un médico argentino considerado el padre de la Nutrición. Creó las Leyes de la Alimentación para conocer la normalidad de un plan alimentario, las cuales son:

- Ley de la Cantidad: todo plan debe cubrir las necesidades calóricas de cada organismo. Por ello debemos estimar el gasto energético del individuo para mantener su balance energético.
- Ley de la Calidad: todo plan debe ser completo en su composición, esto es, debe aportar hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas y minerales. El valor calórico total debe tener una distribución adecuada y tener en cuenta, además, los alimentos protectores.
- Ley de la Armonía: esta ley se refiere a la relación de proporcionalidad entre los distintos nutrientes: 50-60% de hidratos de carbono, 10-15% de proteínas y 25-30% de lípidos.
- Ley de la Adecuación: la alimentación se debe adecuar al momento biológico, a los gustos y hábitos de las personas, a su situación socio-económica y a la/s patología/s que pueda presentar.

Las cuatro leyes están relacionadas entre sí y se complementan. Por lo tanto, desde el punto de vista biológico, se puede decir que existe una sola ley de la alimentación: la alimentación debe ser suficiente, completa, armónica y adecuada. El plan de alimentación correcto es el que responde a estas cuatro leyes [24].

La ley de la calidad hace referencia a una alimentación completa, es decir, que tiene el aporte de todos los nutrientes necesarios. En esta tesis se desarrollará un nutriente en particular: el Calcio.

### 1.2.2 Calcio

#### 1.2.2.1 Generalidades del calcio

El calcio (Ca) es un mineral, un catión divalente, cuyo peso molecular es 40 g/mol. En la composición elemental del cuerpo humano ocupa el quinto lugar después del oxígeno, carbono, hidrógeno y nitrógeno, constituyendo el 1.9% del peso corporal total. El 99% total del Ca se encuentra en el tejido óseo en forma de fosfato de Ca, que se aproxima a la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6]$ , siendo responsable de las características estructurales y funcionales del hueso. El 1% restante se halla distribuido en los líquidos intravascular, intersticial e intracelular desempeñando procesos bioquímicos que incluyen excitabilidad nerviosa, contracción muscular, actividad secretora, activación enzimática, respuesta inmunitaria y coagulación sanguínea [25].

La calcemia promedio es 10 mg/dL, siendo su rango sérico de 8.5 a 10.5 mg/dL (equivalente a 5 meq/L), con una regulación homeostática estrecha que no permite que sus variaciones fisiológicas excedan  $\pm 1.5$  mg/dL. En el plasma, el Ca se encuentra de tres maneras: Ca iónico ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Ca unido a proteínas (principalmente a albúmina) y Ca no ionizable (unido a aniones como citrato o lactato que forman sales

no dissociables) [26].

### **1.2.2.2 Requerimientos nutricionales de calcio**

Los valores de referencia dietéticos se establecen para tener en cuenta las necesidades de crecimiento, desarrollo, funcionamiento y mantenimiento de la salud. El Ca presenta el mayor requerimiento de todos los micronutrientes y, por eso, se lo considera un macronutriente. El requerimiento para cualquier individuo dependerá en gran medida de la edad, el sexo, la actividad física, la biodisponibilidad del Ca en la dieta y de factores genéticos [27].

Una ingesta adecuada de Ca es importante para maximizar el pico de masa ósea durante la infancia y adolescencia, mantenerla durante la edad adulta y minimizar su pérdida en edades avanzadas [28].

Un Comité del Instituto de Medicina (*Institute of Medicine*), encargado de determinar las necesidades de Ca de la población de América del Norte, realizó una revisión exhaustiva de la evidencia de resultados tanto esqueléticos como extraesqueléticos. El Comité concluyó que la evidencia científica disponible respalda un papel clave del Ca en relación a la salud ósea, consistente con una relación de causa y efecto, y proporcionando una base sólida para la determinación de las recomendaciones de ingesta. Para los resultados extraesqueléticos, incluidos el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos autoinmunes, la evidencia es inconsistente, no concluyente en cuanto a la causalidad e insuficiente para informar recomendaciones nutricionales [29].

Los requerimientos de Ca son los mismos para hombres y mujeres durante los primeros 50 años de vida, siendo la IDR más alta durante la adolescencia, cuando ocurre el máximo crecimiento óseo. A partir de los 51 años, la IDR para las mujeres aumenta con el fin de mitigar los efectos de la menopausia sobre la pérdida ósea. La

IDR para los hombres aumenta a partir de los 70 años para preservar la salud ósea y prevenir el desarrollo de osteoporosis [29]. En la Tabla 1 se muestra la IDR de Ca según el sexo y el grupo etario considerado.

**Tabla 1.** IDR de Ca según grupo etario y sexo

<b>Grupo etario</b>	<b>Ca (mg/día)</b>
<i>Infantes</i>	
0-6 meses	200
7-12 meses	200
<i>Niños</i>	
1-3 años	700
4-8 años	1000
<i>Hombres</i>	
9-18 años	1300
19-70 años	1000
>70 años	1200
<i>Mujeres</i>	
9-18 años	1300
19-50 años	1000
51-70 años	1200
>70 años	1200
<i>Embarazo</i>	
14-18 años	1300
19-50 años	1000
<i>Lactancia</i>	
14-18 años	1300
19-50 años	1000

*Adaptada de Food and Nutrition Board, National Academies [30].*

### **1.2.2.3 Fuentes dietarias de calcio**

Para cumplir con la IDR de Ca es necesario consumir diariamente una variedad de alimentos fuentes de este mineral. Se considera alimento fuente de Ca a aquel que

aporta en una porción al menos el 15% de la IDR (150 mg de Ca) [125]. Históricamente, los productos lácteos fueron la fuente predominante de Ca en la dieta, representando el 70% de la ingesta de Ca en la dieta estadounidense en 1984. Hoy, sin embargo, los productos lácteos representan apenas el 40% de la ingesta de Ca, en gran parte, debido a la popularidad de los suplementos dietéticos y la disminución del consumo de leche de vaca [9].

El Ca no es un mineral abundante en los alimentos habituales, aunque está presente en alimentos de origen animal y vegetal. Los productos lácteos (leche, yogur y queso) proporcionan las fuentes más concentradas de Ca en la dieta (Tabla 2); su contenido no varía prácticamente entre los productos enteros o descremados, presentando estos últimos un contenido levemente mayor [31].

**Tabla 2.** Contenido de Ca de lácteos

<b>Alimento</b>	<b>mg Ca/100 g</b>
<i>Leche</i>	
Entera fluida	105
Entera en polvo	900
Descremada fluida	117
Descremada en polvo	1220
<i>Yogur</i>	
Entero/descremado, natural/saborizado	135
Entero/descremado con cereales	120
Entero/descremado con frutas	90
<i>Queso</i>	
Blando	500
Semiduro	700
Duro	1100

*Adaptada de las GAPA [5].*

La Tabla 3 muestra las fuentes vegetales de Ca como son las verduras de hoja

verdes, legumbres, frutas secas y semillas que, si bien aportan Ca, contienen sustancias que disminuyen su biodisponibilidad [16]. Además, esto implicaría consumir cantidades muy altas de estos alimentos con la probabilidad de sufrir intolerancias a nivel digestivo, dados los hábitos alimentarios de la población argentina. Por lo tanto, puede resultar difícil para los consumidores que evitan los lácteos lograr una ingesta adecuada de Ca.

**Tabla 3.** Contenido de Ca de alimentos de origen vegetal

<b>Alimento</b>	<b>mg Ca/100 g</b>
<i>Verduras</i>	
Acelga	51
Berro	120
Brócoli	47
Brotos de soja	67
Coliflor	22
Espinaca	94
Hojas de remolacha	117
Kale	150
Repollito de bruselas	42
Repollo	40
Rúcula	160
<i>Cereales y legumbres</i>	
Harina de garbanzo	100
Harina de soja	263
Harina de trigo	119
Garbanzo	150
Lenteja	46
Poroto	144
Soja	226
<i>Frutas secas</i>	

Almendra	214
Avellana	114
Nuez	97
<i>Semillas</i>	
Lino	200
Sésamo	60
Tofu	118

*Adaptada de las GAPA [5].*

También algunos pescados como la sardina (Tabla 4) aportan alto contenido de Ca, especialmente cuando se los consume con el esqueleto.

**Tabla 4.** Contenido de Ca de pescados

<b>Alimento</b>	<b>mg Ca/100 g</b>
Arenque	101
Pejerrey	105
Bacalao seco	225
Sardina	409

*Adaptada de las GAPA [5].*

Existen productos lácteos que a su vez son fortificados con Ca, tales como leches fluidas y en polvo, yogures y postres lácteos que, si bien constituyen un buen recurso para mejorar el aporte, son alimentos naturalmente fuentes de Ca [32]. También se pueden encontrar productos nutracéuticos con alto aporte de Ca como fuente alternativa [14].

Además, la industria alimentaria ha desarrollado una serie de bebidas fortificadas con Ca sustitutivas de los lácteos (Tabla 5), aunque el costo de las mismas es elevado y aportan alto contenido de azúcares y otros aditivos.

**Tabla 5.** Contenido de Ca promedio de bebidas vegetales fortificadas con Ca

<b>Bebida</b>	<b>mg Ca/100 g</b>
Bebida a base de almendra	140
Bebida a base de arroz	145
Bebida a base de maní	140
Bebida de soja	120
Bebida a base de coco	130

*Contenido de Ca promedio (mg%) calculado a partir de los alimentos hallados en el vademécum Nutrinfo [32].*

#### 1.2.2.4 Absorción intestinal de calcio

La absorción de Ca es de aproximadamente un 35% pero varía a lo largo del ciclo de la vida, siendo la etapa de lactancia el período de mayor absorción, con un porcentaje que oscila entre 55 y 60%; en la adolescencia estos valores descienden a 35-40% para establecerse alrededor del 30% en la etapa adulta. A partir de la mitad de la vida en adelante, la eficiencia de absorción declina casi 0.2% por año, con un porcentaje adicional del 2% en la menopausia [33].

La cantidad de Ca absorbida depende principalmente de la cantidad consumida, el tiempo de tránsito en diferentes partes del intestino y la solubilidad del mismo, que es inversamente proporcional al pH intraluminal: cuando el pH disminuye la absorción del Ca aumenta. El pH promedio del intestino delgado es 7.3 y el del colon 6.6. El duodeno es el sitio con la máxima solubilidad de Ca, ya que el pH promedio es 6.0 y es el más bajo de todo el intestino. Aunque se absorbe más eficazmente en duodeno y yeyuno con un pH más bajo, la cantidad de Ca absorbida en el íleon es mayor, alrededor de un 65%, debido a que el contenido es retenido 10 veces más en dicho sitio [34].

La absorción de Ca es un proceso que disminuye a medida que aumenta la

cantidad ingerida, siendo un mecanismo adaptativo y protector de las altas concentraciones de Ca luminal. Se ha demostrado que cuando las concentraciones de Ca en los alimentos superan los 1000 mg/día, la absorción neta de Ca no supera los 500-600 mg/día y se incrementa el Ca fecal [35].

La absorción de Ca ocurre a través de dos mecanismos principales: transporte transcelular impulsado metabólicamente y una vía pasiva no saturable llamada vía paracelular. Ambas vías están reguladas por hormonas, nutrientes y otros factores [36].

### *1.2.2.4.1 Vía transcelular*

La absorción intestinal transcelular de Ca es un proceso activo dependiente de ATP, que ocurre principalmente en el intestino delgado, y que es responsable de aproximadamente el 90% de la absorción total de Ca. El tiempo de permanencia en cada segmento intestinal y la solubilidad del Ca son factores importantes que afectan su absorción [37].

Cuando el Ca luminal es menor que el Ca plasmático, el catión se absorbe activamente a través de la vía transcelular [34]. Esta vía implica el movimiento de Ca desde el lado mucoso al seroso de la barrera intestinal, ocurriendo contra un gradiente de concentración. Es un proceso saturable activo que predomina en el duodeno y yeyuno, y está regulado por factores nutricionales y fisiológicos, principalmente por la vitamina D [38]. En intestino, la 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D o calcitriol estimula el transporte de Ca transcelular a través de la activación del canal apical de Ca, el receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 5 y 6 (TRPV5/6) o transportador de Ca 1 (CAT1), la calbindina-D 9k intracelular (CBD9k), la bomba de Ca de la membrana basolateral (PMCA1b) y el intercambiador de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> (NCX1) [39]. La acción del calcitriol está mediada por mecanismos genómicos y no genómicos a través de la unión al receptor

de vitamina D (VDR), el cual media sus efectos [40]. Otras proteínas como el receptor sensor de Ca (CaR) y la fosfatasa alcalina intestinal (IAP) son proteínas que coexpresan con las mencionadas.

### *1.2.2.4.2 Vía paracelular*

Cuando el Ca luminal es más alto que el del plasma, el Ca ingresa al intestino a través de la vía paracelular, a través de uniones estrechas entre los enterocitos. Es un transporte pasivo y no saturable, que se produce a lo largo de todo el intestino delgado, predominando en el íleon por su longitud y tiempo de tránsito. Es un mecanismo que depende de la concentración luminal de Ca y del gradiente eléctrico a través del epitelio, siendo la cantidad transportada proporcional a la concentración luminal. Dicha vía adquiere importancia cuando la ingesta de Ca es elevada porque el tiempo de permanencia en el intestino es corto y, a la vez, se encuentran inhibidas las proteínas involucradas en la vía transcelular [36].

La Figura 2 muestra los dos mecanismos involucrados en la absorción intestinal de Ca.

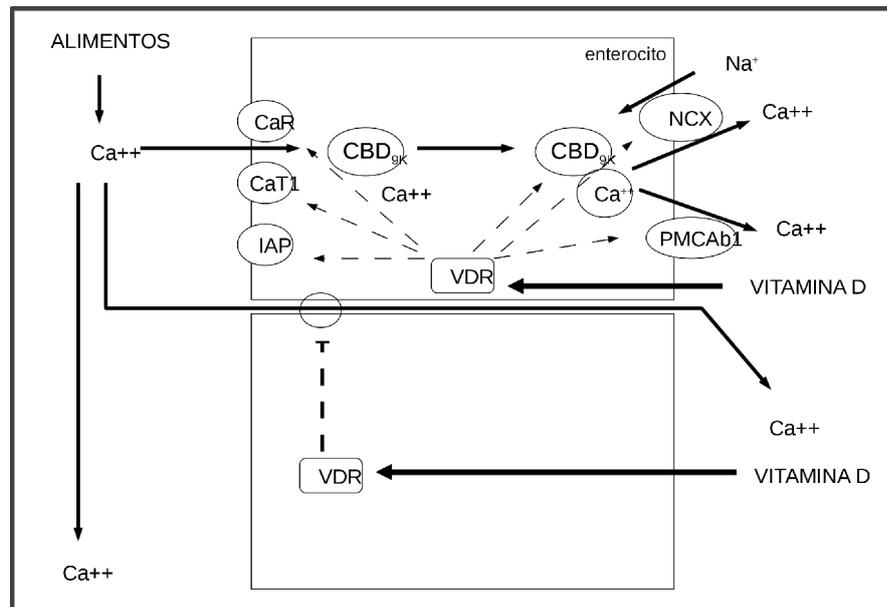


Figura 2. Descripción de las proteínas y procesos involucrados en el control de los mecanismos de absorción de Ca a nivel intestinal. Adaptada de [40].

#### 1.2.2.4.3 Factores condicionantes de la absorción del calcio

La deficiencia de Ca puede deberse a una baja ingesta o a una inadecuada absorción, existiendo factores facilitadores e inhibidores de la misma.

Factores facilitadores:

##### 1. Lactosa

Se han realizado trabajos en los cuales se comparó la absorción de Ca en presencia de lactosa y otros hidratos de carbono, hallándose que hay una mejor absorción de Ca en presencia de lactosa [6].

##### 2. Proteínas y péptidos

Las proteínas y los péptidos derivados de los alimentos juegan un papel importante en el tracto intestinal antes de ser absorbidos. Por ejemplo, algunas proteínas y péptidos tienen la capacidad de regular la actividad enzimática, modulando así la absorción de nutrientes. Se observó que algunos péptidos de la leche estimulan

el transportador de Ca en los enterocitos [4].

### 3. Fosfopéptidos derivados de la caseína de la leche

Se ha demostrado que los fosfopéptidos de caseína (CPP) son quelantes de Ca. Un estudio reciente demostró que un péptido monomérico aislado de fosfopéptidos de caseína (F6-1) mejoró el transporte de Ca en células Caco-2 al afectar la vía transcelular, regulando la expresión de TRPV6. Además, F6-1 mejoró la formación ósea y previno la resorción ósea [9]. Actualmente, los CPP están siendo evaluados para la producción de alimentos funcionales [41].

### 4. Fructooligosacáridos

Los *Fructooligosacáridos* (FOS) y la inulina son prebióticos conocidos como fibra activa, los cuales aumentan la absorción intestinal de Ca a través de los siguientes mecanismos: alteración de la composición de la microbiota intestinal, producción de ácidos grasos de cadena corta, disminución del pH intestinal, modificación de biomarcadores y regulación del sistema inmunológico. Se observó que son suficientes 15 g/día de FOS para estimular la fracción absorbible de Ca. Ingestas superiores a 20-30 g/día podrían ocasionar molestia intestinal [35].

### 5. Isoflavonas

Las isoflavonas son componentes biológicos presentes en las plantas, especialmente en las leguminosas como la soja. Corresponden a una subclase de los compuestos llamados flavonoides y por su estructura química son considerados fitoestrógenos (similar a los estrógenos humanos) [42].

Las isoflavonas se han estudiado como tratamiento complementario de la osteoporosis ya que actúan inhibiendo la resorción ósea y estimulando la actividad osteoblástica [43]. El número de casos de osteoporosis en los países de Europa Occidental es elevado, lo que se relaciona con el bajo consumo de soja y sus

productos, en comparación con los países asiáticos, donde la soja es el principal componente de la dieta [44]. Mientras el estilo de alimentación asiática incluye un consumo estimado entre 20 y 150 mg/día de isoflavonas, la alimentación occidental contiene alrededor de 3 a 5 mg/día. Se debe tener en cuenta que se aportan aproximadamente de 1 a 3 mg de isoflavonas por gramo de proteína de soja, variando ampliamente el contenido según el tipo de grano, suelo y clima [45].

Otro factor que estimula la absorción de Ca es la Vitamina D, ya mencionada anteriormente.

Factores inhibidores:

### 1. *Ácido oxálico*

Dentro de las sustancias desfavorables, el ácido oxálico es el inhibidor más potente de la absorción de Ca, ya que al combinarse forman oxalato de Ca, un compuesto insoluble [46]. Los oxalatos se encuentran presente en altas cantidades en vegetales como acelga, espinaca, remolacha y cacao [34]. Un estudio evaluó la absorción de Ca de espinaca y leche de vaca en 13 individuos sanos. La leche tuvo mayor absorción en todos los casos, con una absorción media del 27.6% y la espinaca del 5.1% [47].

### 2. *Fitato*

El contenido de fitato tiene una correlación negativa con la biodisponibilidad de Ca, por la formación de quelatos insolubles. Se encuentra presente en legumbres y cereales integrales pero, cuando éstos se panifican, el ácido fítico es degradado por la fitasa de las levaduras fermentadoras, reduciéndose el efecto inhibidor. Otros alimentos con alto contenido de fitato son el cacao en polvo, las semillas de sésamo y girasol y las frutas secas [33].

Heaney et al. (1991) informó que una reducción del contenido de fitato en

semillas de soja de alrededor del 69.2% (de 978 a 301 mg/100 g) podría aumentar la dializabilidad del Ca en aproximadamente un 33.5% (de 31% a 41.4%) [48]. Otro estudio reportó una alta dializabilidad de Ca en vegetales Brassica, que son esencialmente vegetales libres de fitatos y oxalatos [49]. En otro estudio se halló que las semillas de soja cocidas tienen niveles medios de fitato (292 y 398 mg/100 g), mientras que las semillas de sésamo tienen altas concentraciones; además se clasificaron de acuerdo con sus dializabilidades de Ca, en los grupos de niveles medio y bajo de biodisponibilidad de Ca, respectivamente [50].

### 3. *Fibra alimentaria*

La fracción de la fibra alimentaria que contiene residuos de ácidos urónicos y fítico es capaz de secuestrar iones de Ca en el medio intestinal. Este efecto es debido a que estos grupos están desprotonados con el pH intestinal y pueden interactuar electrostáticamente con los minerales catiónicos [51]. No obstante, dado que éstos pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal, se produce la liberación del Ca, cuya absorción a este nivel puede ayudar a mantener su balance, siempre que el aporte de Ca sea suficiente [33].

Un estudio evaluó el contenido de Ca y la biodisponibilidad *in vitro* de alimentos de origen vegetal y halló que el kale, apio, col rizada, col china y brotes de soja tienen alto contenido de Ca, baja concentración de oxalatos, fitatos, fibra dietaria y, alta dializabilidad de Ca, aunque cuando se lo comparó con la leche de vaca tanto el contenido de Ca como la dializabilidad fueron menores [50].

Las bebidas de origen vegetal no fortificadas con Ca presentan menor contenido de Ca que la leche de vaca, sin embargo las fortificadas presentan valores más altos y mayor bioaccesibilidad de Ca (estudio *in vitro*) que la leche de vaca [52,53].

1.2.2.5 Regulación metabólica del calcio

El Ca sérico se encuentra en una homeostasis permanente debido a que está regulado por hormonas calcitóricas: parathormona (PTH), calcitonina (CT) y 1,25-dihidroxitamina D (o calcitriol) que, actúan principalmente sobre el hueso, los riñones y el intestino [25]. La Figura 3 esquematiza los efectos hormonales sobre dichos órganos ante una situación de hipocalcemia.

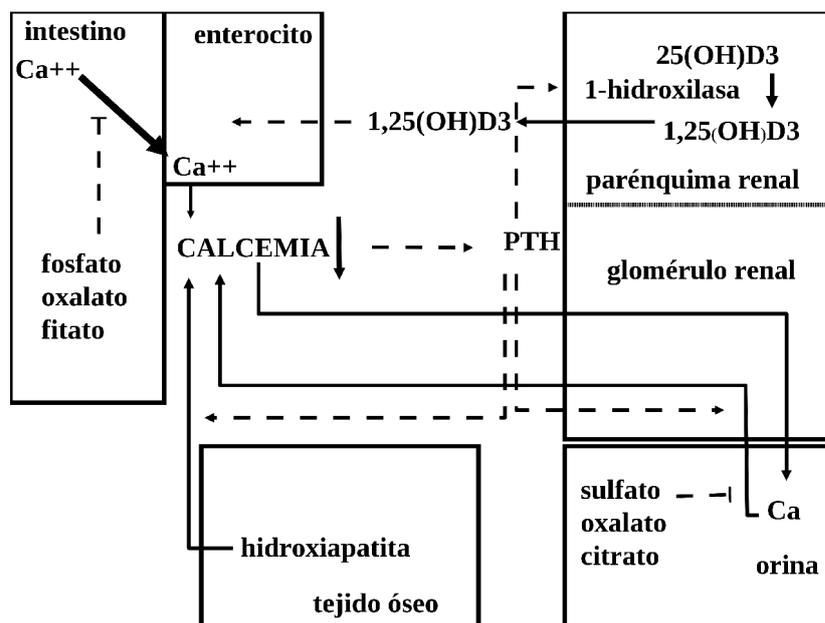


Figura 3. Absorción, excreción y deposición ósea de Ca. Las flechas (→) continuas indican procesos o flujos, la líneas de guiones con punta (-→) procesos de regulación estimulatorios y las línea de guiones sin punta (----) procesos de regulación inhibitorios. Adaptada de [40].

A continuación se enuncian los factores involucrados en la regulación del Ca.

1.2.2.5.1 Parathormona

La PTH es una hormona proteica de 84 aminoácidos, sintetizada por las glándulas paratiroides que interviene en la regulación del metabolismo fosfo-cálcico. Esta hormona contribuye a mantener la concentración de Ca en el líquido extracelular (LEC), siendo el principal estímulo para su secreción una hipocalcemia. A nivel óseo,

la PTH estimula la liberación de RANKL por los osteoblastos, lo que induce a la proliferación de osteoclastos con el consecuente aumento de la resorción ósea (proceso de degradación de tejido óseo con liberación de Ca y otros componentes al LEC). A nivel renal, la PTH estimula los receptores asociados a adenilil ciclasa en las células de los túbulos renales contorneados distales, aumentando la reabsorción de Ca y como consecuencia, disminuyendo la excreción de Ca por orina. Además, estimula la actividad de la enzima 1-alfa-hidroxilasa en el riñón que incrementa los niveles de vitamina D activa (1,25-dihidroxitamina D) en el plasma y como consecuencia hay una mayor absorción de Ca a nivel intestinal. Por otra parte, la PTH aumenta la eliminación de fosfato debido a que inhibe la reabsorción de este ion en el nefrón proximal y, en menor proporción, en el distal. La movilización del mineral óseo aumenta el Ca y fosfato circulantes. El incremento de la fosfaturia por la PTH previene la formación de fosfato de Ca en sitios no deseados (conocido como calcificaciones ectópicas) ante una hipercalcemia [26].

La excreción de Ca por orina es controlada por la CT y la PTH que regulan la reabsorción tubular y la salida de Ca del hueso o resorción ósea. La estructura ósea si bien depende de la CT y PTH, éstas no tienen la función de fortalecer o debilitar la estructura ósea. En cambio, la hormona de crecimiento e insulina que tienen un rol anabólico, favorecen la formación ósea, sin influenciar demasiado en la resorción. Por otra parte, un rol importante lo tiene el trabajo de los músculos estriados que al ejercer fuerzas sobre el hueso impulsan los procesos de formación ósea y fortalecimiento. Contrariamente, la falta de trabajo muscular y, como consecuencia la carencia de fuerza, tiende a hacer que se forme menos tejido óseo y por ende los huesos pierdan resistencia [26].

### 1.2.2.5.2 Calcitonina

La CT es una hormona peptídica lineal, compuesta por 32 aminoácidos que intervienen en la regulación del metabolismo fosfo-cálcico. Se secreta ante una hipercalcemia y sus efectos principales están orientados a disminuir la calcemia mediante el aumento de la excreción urinaria de Ca por inhibición de la reabsorción tubular renal. También tiene efecto inhibitorio sobre la actividad osteoclástica, disminuyendo así la resorción ósea. Los efectos de la CT son llevados a cabo a través de su unión al receptor de calcitonina (CT-R), dependiente de AMPc. La unión de CT al CT-R produce la activación de proteínas, entre ellas, el péptido A relacionado a la CT (CALCA) que, en presencia de ésta aumenta el ingreso de Ca a las células. Por otra parte, también aumenta la expresión del péptido B relacionado a la CT (CALCB) que estimula la vasodilatación [54].

### 1.2.2.5.3 Vitamina D

La vitamina D es un derivado de esteroide responsable de la homeostasis del Ca y el metabolismo óseo. Ésta puede provenir de los alimentos o formarse en la piel por acción de los rayos ultravioleta sobre el 7-dehidrocolesterol. Independientemente del origen, la vitamina D pasa a sangre donde es transportada por la proteína transportadora de vitamina (DBP). La vitamina D es hidroxilada en hígado a 25-hidroxivitamina D por la enzima 25-hidroxilasa, enzima no controlada por PTH. Posteriormente, la 25-hidroxivitamina D es hidroxilada en posición 1 por acción de la enzima 1-hidroxilasa renal, activada por PTH e inhibida por fosfato y fosfatoninas. Como consecuencia se forma 1,25-dihidroxivitamina D o calcitriol. El calcitriol ejerce sus efectos a nivel de los tejidos a través de receptores nucleares de vitamina D (VDR), los que se hallan inactivos por unión a proteínas del shock térmico (Hsp). Cuando se libera calcitriol, el VDR se libera de Hsp y se heterodimeriza con el receptor

de retinoide X (RXR) y se une a elementos de respuesta a vitamina D (DRE) activando o inhibiendo genes necesarios [54].

Otras fuentes dietéticas de vitamina D (formas de vitamina D2 y D3) son el pescado azul como el salmón (300-1000 UI), atún (230 UI) o caballa (250 UI), o bebidas fortificadas o productos lácteos (100 UI/250 mL), o suplementos de vitamina D o multivitamínicos (400-1000 UI) [55].

La forma activa de la vitamina D promueve la absorción de Ca en el intestino delgado, suprime la secreción de la hormona paratiroidea, influye en la mineralización de la placa de crecimiento y estimula la diferenciación de los osteoclastos a través de los receptores de los osteoblastos [56].

### **1.2.2.6 Patologías relacionadas a la ingesta y metabolismo del calcio**

Son numerosas las patologías que pueden afectar el aporte de Ca. Sin embargo, las más importantes son aquellas en que se debe restringir la ingesta de lácteos. En algunos casos se debe a desórdenes del aparato digestivo y en otras a déficit enzimáticos intracelulares. En la Figura 4 se muestran las principales enzimas involucradas en el metabolismo de la lactosa y galactosa.

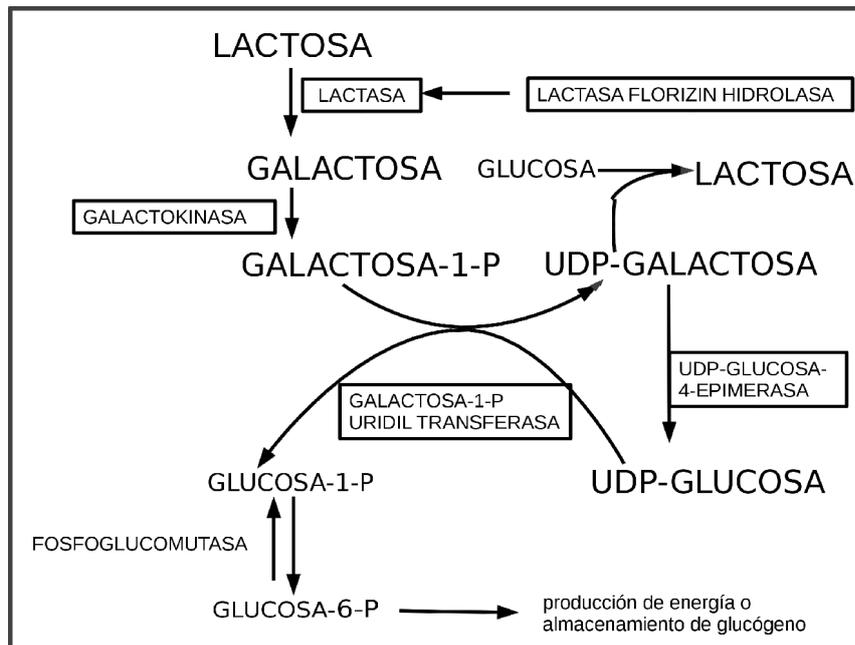


Figura 4. Metabolismo de la lactosa en seres humanos. En recuadro se muestran las enzimas cuyas deficiencias genéticas conducen a la imposibilidad de consumir lácteos con contenido normal de lactosa. Adaptada de [40].

Entre ellas tenemos a las que se describen brevemente a continuación.

#### *Deficiencia congénita de lactasa (COLACD)*

Es un trastorno gastrointestinal autosómico recesivo, caracterizada por déficit del gen que codifica para la proteína lactasa-florizín hidrolasa (*LCT*), precursora de la enzima lactasa. Se encuentra una falta casi total de actividad de *LCT* en el material de biopsia yeyunal. Se caracteriza por diarreas acuosas en bebés alimentados con leche materna y otras fórmulas que contienen lactosa [57].

#### *Intolerancia a la lactosa o no persistencia de lactasa*

Se presenta por un déficit en la actividad de la enzima lactasa intestinal pero no por alteración del gen que la codifica. Esta disminución que ocurre en la niñez o edad adulta, está asociada a algunas variantes del gen no codificante *MCM6*. Los europeos del norte tienen la característica de mantener la enzima a diferencia de otras etnias

[57]. Los mamíferos adultos son normalmente intolerantes a la lactosa y más del 75% de la población adulta humana sufre deficiencia de lactasa. Dicho déficit está presente un 80% en los humanos de raza africana, y hasta un 100% en los indios americanos y los asiáticos. Las personas con intolerancia a la lactosa son incapaces de digerir cantidades significativas de lactosa. Debido al nivel de lactasa reducida, la lactosa presente en los productos lácteos no puede ser digerida en el intestino delgado y en su lugar son fermentados por las bacterias intestinales. Los síntomas comunes incluyen dolor y distensión abdominal, flatulencia excesiva, y las deposiciones líquidas después de la ingestión de alimentos que contienen lactosa. El exceso de lactosa puede estar presente en la orina [58].

### *Galactosemia 1 (GALAC1)*

Es una enfermedad causada por deficiencia del gen que codifica para la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (*GALT*). Es una forma de galactosemia, un error innato del metabolismo de la galactosa, que se manifiesta típicamente en el período neonatal, después de la ingestión de galactosa, con ictericia, hepatoesplenomegalia, insuficiencia hepatocelular, intolerancia alimentaria, hipoglucemia, disfunción tubular renal, hipotonía muscular, sepsis y cataratas. La herencia de *GALAC1* es autosómica recesiva. Las complicaciones a largo plazo incluyen retraso mental, dispraxia verbal, anomalías motoras e hipogonadismo hipergonadotrópico. El tratamiento incluye una dieta libre de galactosa, antibióticos, y administración de vitamina K [59].

### *Galactosemia por déficit epimerasa (GALAC3)*

Es una forma de galactosemia, un error innato del metabolismo de la galactosa que se manifiesta típicamente en el período neonatal, después de la ingestión de galactosa, con ictericia, hepatoesplenomegalia, insuficiencia hepatocelular, intolerancia alimentaria, hipoglucemia, disfunción tubular renal, hipotonía muscular, sepsis y

cataratas. GALAC3 es una forma autosómica recesiva causada por la deficiencia de galactosa epimerasa. Puede manifestarse como una forma periférica benigna con síntomas leves y deficiencia enzimática solo en las células sanguíneas circulantes. Una segunda forma, conocida como deficiencia de epimerasa generalizada, se caracteriza por niveles indetectables de actividad enzimática en todos los tejidos y características clínicas graves, que incluyen crecimiento restringido y discapacidad intelectual [60].

### *Galactosemia II (GALAC2)*

Enfermedad autosómica recesiva caracteriza por déficit del gen que codifica la enzima galactoquinasa (*GALK1*). Se manifiesta típicamente en el período neonatal, después de la ingestión de galactosa, con ictericia, hepatoesplenomegalia, insuficiencia hepatocelular, intolerancia alimentaria, hipoglucemia, disfunción tubular renal, hipotonía muscular, sepsis y cataratas. La formación de cataratas es el resultado de fenómenos osmóticos causados por la acumulación de galactitol en el cristalino [61].

### *Osteoporosis*

La osteoporosis es una enfermedad esquelética difusa caracterizada por una disminución de la resistencia ósea que predispone a un mayor riesgo de fracturas por fragilidad. La evidencia científica señala una fuerte asociación entre baja ingesta de Ca y disminución de la densidad mineral ósea (DMO). Por lo tanto, la ingesta adecuada de este mineral puede tener impacto en la reducción del riesgo de fracturas originadas por osteoporosis. Se estima que un incremento de masa ósea del 10% podría reducir el riesgo de las fracturas en un 50%. Su prevención debe basarse en crear conciencia respecto de la importancia de una adecuada ingesta de Ca en todas las etapas de la

vida, manteniendo niveles adecuados de vitamina D y ejercicio, dada la íntima relación que existe entre el metabolismo del Ca, el ejercicio físico y la vitamina D en relación con la salud ósea [5].

El metabolismo del fósforo y el Ca están estrechamente relacionados ya que comparten factores de regulación como la vitamina D y la PTH, y ambos minerales representan los principales componentes de la masa ósea (hidroxiapatita). De hecho, un desequilibrio crónico de la ingesta dietética de Ca y fósforo conduce a la pérdida ósea [62]. En los países occidentales la ingesta de fósforo está por encima de la recomendación que es de 700, 1250 y 500 mg/día para adultos adolescentes y niños, respectivamente [30, 63]. Esto se debe principalmente al mayor consumo de alimentos ultrapreparados tratados con aditivos de fosfato, que van desde productos horneados hasta bebidas cola [64].

El fósforo es necesario en los períodos de rápido crecimiento óseo, pero debe estar en proporciones balanceadas con el Ca para que no actúe con función “antiosificante”. Por ser un componente de todas las células, el fósforo se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos. Sin embargo, algunos de ellos son los más significativos por el alto consumo en la población occidental. Las bebidas cola tienen alto contenido de fósforo, presentan una concentración de hasta 18 mg%, con un contenido prácticamente nulo de Ca: una botella de refresco de 375 mL puede proporcionar hasta 67.5 mg de ácido fosfórico. Estudios realizados por diversos autores, indican que las bebidas carbonatadas pueden llegar a aportar hasta 1.000 mg de fósforo diario [33]. Considerando un consumo diario de 500 mL/día de bebidas analcohólicas se estarían incorporando 3.87 mg Ca y 27.59 mg de fósforo. Se vio que la ingestión excesiva de fosfatos a través de estas bebidas, puede explicar la aparición de la alta prevalencia de osteoporosis en las sociedades desarrolladas. Su consumo

excesivo no permitiría alcanzar una masa ósea máxima por el alto contenido de fosfatos. Por otro lado, su elevada ingesta se asocia al bajo consumo de refrescos ricos en Ca, conocida esta situación como “efecto de desplazamiento de la leche” [124]. Según el estudio Hidratar 2, a medida que aumenta la edad se incrementa la ingesta de bebidas azucaradas en el desayuno y merienda, a expensas de una disminución del consumo de lácteos [65].

### 1.2.2.7 Evaluación del calcio a nivel poblacional

Desafortunadamente, no existen indicadores prácticos a nivel poblacional para evaluar el estado del Ca. Como se mencionó anteriormente, el Ca sérico está regulado por un mecanismo homeostático muy eficiente y sofisticado, lo que lo convierte en un indicador poco fiable. Por esta razón, en la mayoría de los países se desconoce la prevalencia de deficiencia. En ausencia de indicadores bioquímicos confiables, el mejor método para evaluar el Ca es comparar la ingesta dietética con su IDR. Las mediciones de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo han proporcionado un medio alternativo para evaluar la deficiencia de Ca en algunos países. En los Estados Unidos, por ejemplo, se ha estimado que entre 5 y 6 millones de mujeres mayores y entre 1 y 2 millones de hombres mayores tienen osteoporosis. Otros enfoques incluyen la medición de marcadores de resorción ósea en orina o plasma, que tienden a ser más altos en individuos con deficiencia de Ca. Sin embargo, tales métodos son relativamente caros. Todas las medidas anteriores se ven afectadas, entre muchos otros factores (estado de vitamina D, nivel de actividad física y niveles hormonales), lo que complica aún más la evaluación del Ca a nivel poblacional [22].

### 1.2.2.8 Toxicidad

No suelen producirse ingestas excesivas de Ca de procedencia alimentaria, pero sí pueden ocurrir por el consumo de suplementos de este mineral. Dosis superiores a 2 g/día pueden ocasionar hipercalcemia, sobre todo si se ingieren suplementos de Ca y vitamina D combinados. La intoxicación por hipercalcemia puede tener efectos leves o graves, dependiendo de su intensidad. Además, de interferir en la absorción de otros cationes divalentes como hierro, magnesio y zinc, la hipercalcemia puede ocasionar estreñimiento, náuseas, poliuria, cálculos renales y, en situaciones extremas, la pérdida de tono muscular, el coma y la muerte [66].

### 1.2.2.9 Déficit de calcio

La carencia de Ca puede ser ocasionada por un aporte dietético insuficiente, por la deficiencia de vitamina D o por la baja relación Ca/fósforo en la dieta. Dado que el hueso actúa como reservorio de Ca, es difícil que se mantenga una situación de hipocalcemia; por lo tanto, el efecto de la carencia de Ca es una insuficiente mineralización de la matriz ósea, que es lo que constituye, en las etapas infantil y adolescente, el raquitismo, y en la edad adulta, la osteomalacia [66].

Las numerosas funciones metabólicas del Ca se mantienen incluso cuando las ingestas son bajas porque el Ca se extrae del hueso si los mecanismos homeostáticos no logran mantener un estado adecuado de Ca en el LEC. Por tanto, la ingesta inadecuada de Ca conduce a una disminución de la mineralización ósea y, posteriormente, a un mayor riesgo de osteoporosis en adultos.

Es altamente probable que la ingesta de Ca esté por debajo de los niveles recomendados cuando la ingesta de productos lácteos es baja. Los productos lácteos suministran entre el 50% y el 80% del Ca de la dieta en la mayoría de los países industrializados, mientras que los alimentos de origen vegetal suministran alrededor

del 25% [9]. La ingesta de Ca a partir de los productos lácteos es un medio adecuado para cumplir los requerimientos de este mineral aunque las personas no suelen consumirlos en las cantidades establecidas por las guías clínicas. La suplementación con las tabletas es costoso y, a veces, implica que existan dificultades de la adherencia al tratamiento [67].

### 1.2.3 Estrategias para aumentar la ingesta de nutrientes

Existen tres estrategias que se utilizan para aumentar el consumo de nutrientes que son deficientes en la población denominadas *fortificación*, *enriquecimiento* y *suplementación*.

Los alimentos fortificados y enriquecidos se encuentran detallados en el capítulo XVII del Código Alimentario Argentino (CAA), denominado “Alimentos de régimen o dietéticos”. Son alimentos envasados, preparados especialmente, que se diferencian por su composición y/o por sus modificaciones físicas, químicas, biológicas o de otra índole, resultantes de su proceso de fabricación o de la adición, sustracción o sustitución de determinadas sustancias componentes. Están destinados a satisfacer necesidades particulares de nutrición y alimentación de determinados grupos poblacionales [66].

#### 1.2.3.1 Alimentos enriquecidos

Los alimentos enriquecidos son definidos como “*aquellos a los que se han adicionado nutrientes esenciales (vitaminas y/o minerales y/o proteínas y/o aminoácidos esenciales y/o ácidos grasos esenciales) con el objeto de resolver deficiencias de la alimentación que se traducen en fenómenos de carencia colectiva*”. Los alimentos enriquecidos poseen una incorporación de nutrientes considerados necesarios por la autoridad sanitaria a fin de contribuir en la mejora de las carencias

de nutrientes que existen en la población, ya sea que presentan estados fisiológicos particulares o que requieren una incorporación de cierto/s nutriente/s en mayor concentración para prevenir patologías endémicas en el país. La autoridad sanitaria define cuáles son los alimentos a los cuales se les deberá añadir los nutrientes en cuestión, definiendo el tipo de nutriente específico y la cantidad que debe incorporar. Esta decisión debe estar debidamente reglamentada a través de la normativa nacional, cuyo cumplimiento es obligatorio. Al respecto, en Argentina existen tres alimentos que deben ser enriquecidos: la leche en polvo entregada en los programas alimentarios (hierro, zinc y ácido ascórbico), las harinas de trigo (ácido fólico, tiamina, riboflavina y niacina), y la sal de mesa (iodo) [68].

### 1.2.3.2 Alimentos fortificados

El CAA define como alimentos fortificados a *“aquellos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente”*. Este tipo de alimentos se elaboran especialmente con un contenido mayor de algún nutriente, su fin es satisfacer necesidades alimentarias específicas de determinados grupos de personas sanas, y por lo general, son elecciones que toma la industria para agregar valor a sus productos. La fortificación no es obligatoria, pero en caso que una empresa decida hacerlo deberá cumplir con ciertos requisitos. La porción del alimento fortificado deberá aportar entre un 20% y 50% para vitaminas liposolubles y minerales y hasta un 100% de los requerimientos diarios recomendados de vitaminas hidrosolubles. Estos valores deben cumplirse en la porción del producto. Para un alimento o bebida fortificada en Ca, se debe aportar entre 300 y 500 mg por porción.

Los nutrientes incorporados deben:

- Ser estables en el alimento en las condiciones habituales de almacenamiento, distribución, expendio y consumo y presentar una adecuada biodisponibilidad.
- No presentar incompatibilidad con ninguno de los componentes del alimento ni con otro nutriente agregado.
- Estar presente en niveles tales que no ocasionen una ingesta excesiva por efecto acumulativo a partir de otras fuentes de la dieta [69].

### 1.2.3.3 Suplementos dietarios

Una tercera estrategia que es utilizada en escenarios en que la ingesta de Ca es insuficiente, no pudiendo cubrirse a través de los alimentos, es la suplementación.

El CAA define a los suplementos dietarios como *“productos destinados a incrementar la ingesta dietaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes y/u otros ingredientes en la dieta de las personas sanas que, no encontrándose en condiciones patológicas, presenten necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales”*. Deben ser de administración oral y pueden presentarse en formas sólidas (comprimidos, cápsulas, granulado, polvos u otras) o líquidas (gotas, solución, u otras). Las vitaminas y minerales propuestos para suplementar la dieta deben cubrir no menos del 30% de la IDR [69].

La ingesta adecuada de Ca en el embarazo y en la lactancia se sitúa entre 1.200 y 1.500 mg/día. Estos aportes deberían satisfacerse prioritariamente a partir de la ingesta de alimentos. La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre suplementos de Ca durante la gestación demuestran una relación inversa entre el consumo de Ca en la dieta y la incidencia de enfermedad hipertensiva del embarazo. No obstante, en la actualidad no se tienen datos suficientes para aconsejar la suplementación universal con Ca durante el embarazo [70].

En contextos en que el Ca de la dieta es insuficiente, la suplementación es una

estrategia importante para reducir las consecuencias graves de preeclampsia. En casos en que la administración de suplementos de dosis alta no sea factible, se puede considerar la opción de suplementos de dosis más bajas (500 a 600 mg diarios) en lugar de no administrarlos [70]. Otro escenario en que la suplementación está indicada es en personas con osteoporosis y con una ingesta de Ca inferior a 800 mg/día [71].

### 1.2.4 Experiencia en fortificación con calcio

La harina de trigo se fortificó por primera vez con Ca en Reino Unido en 1943 para restaurar el Ca perdido durante la molienda. Actualmente, en Reino Unido es obligatorio añadir 940-1560 mg de carbonato cálcico/kg a las harinas blancas y pardas (pero no integrales) molidas. En Estados Unidos, la adición de Ca a la harina ha sido opcional desde principios de la década de 1940. La gama de alimentos fortificados con Ca ha crecido de manera constante a lo largo de los años, ya que fue creciendo la evidencia de la baja ingesta de Ca en diversas poblaciones. Las sales de Ca más solubles, como el citrato, malato o el gluconato, se usan generalmente para fortificar jugos y otras bebidas. El fosfato de Ca tribásico, y en ocasiones el carbonato o lactato de Ca, se utilizan para fortificar la leche, a la que también se deben agregar gomas (por ejemplo, carragenina, goma guar) para evitar que la sal de Ca sedimente. El yogur y la ricota también pueden ser fortificados con estos compuestos de Ca. En los países industrializados y en algunos países asiáticos, las bebidas de soja se comercializan como sustituto de la leche de vaca, en cuyo caso también deben fortificarse con Ca. Los estabilizadores como el hexametáfosfato de sodio o el citrato de potasio pueden mejorar la calidad de las bebidas de soja fortificadas con gluconato de Ca o lactogluconato. La adición de sales de Ca a algunos alimentos puede provocar cambios indeseables de color, textura y estabilidad al aumentar la reticulación de proteínas, pectinas y gomas. Los fortificantes de Ca también pueden

oscurecer el color de las bebidas de chocolate [22].

Disponer de alternativas alimenticias ricas en Ca que eviten los problemas mencionados contribuirá a mantener una ingesta de Ca adecuada a lo largo de la vida. El desarrollo de una bebida en base a jugos de frutas, cáscara de huevo y kéfir se ha pensado como una alternativa económica de preparación doméstica. A continuación se describe la evidencia científica de los ingredientes utilizados.

### **1.2.5 Componentes de la bebida**

#### ***1.2.5.1 Cáscara de huevo de gallina***

Desde tiempos prehistóricos, los seres humanos han utilizado al huevo de gallina como fuente de alimento. No solo el huevo es una importante fuente nutricional, sino que su cáscara presenta componentes nutricionales y no nutricionales. Se genera una gran cantidad de desechos de cáscara de huevo a nivel mundial y se destaca que es una fuente rica en minerales, especialmente Ca. Por lo tanto, ésta puede ser una alternativa de bajo costo a los suplementos comerciales recomendados por la OMS [72].

La cáscara de huevo está compuesta por un 38% de Ca, además de aportar otros micronutrientes [67,73] (Tabla 6). Otros microelementos como boro, cobre, hierro, molibdeno, azufre, silicio y zinc también están presentes [74]. Para cumplir con la IDR de Ca, aproximadamente, 2 g de cáscara de huevo/día/persona sería suficiente [67].

**Tabla 6.** Composición química de la cáscara de huevo de gallina

Sustancia	Media $\pm$ DS
Calcio	38.2 $\pm$ 3.5
Carbonato	44.3 $\pm$ 3.2
Sodio	0.51 $\pm$ 0.09
Fosfato	0.44 $\pm$ 0.06
Sulfato	0.32 $\pm$ 0.07
Potasio	0.14 $\pm$ 0.05
Estroncio	0.14 $\pm$ 0.02
Flúor	1.8 $\times 10^{-6}$ $\pm$ 1.1 $\times 10^{-6}$
Materia orgánica	16.1 $\pm$ 4.6
Materia inorgánica	83.9 $\pm$ 5.0

*Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (DS) en g cada 100 g de cáscara. Adaptada de [67].*

La cáscara de huevo de gallina mejoró el estado nutricional de personas que viven en África subsahariana y, además, se halló que la adición de cáscara de huevo molida a los alimentos tradicionales es un enfoque seguro y aceptable para aumentar la ingesta de Ca en la dieta [72].

La mejor manera de utilizar la cáscara de huevo como suplemento dietético de Ca es en polvo para agregar al pan, pizza o espagueti, ya que se evidenciaron pequeños cambios en la textura y no se apreciaron cambios en el sabor. Además, se encontró que no existe diferencia significativa en la absorción del Ca proveniente de la cáscara de huevo con respecto a la absorción de Ca proveniente del carbonato de Ca en ratas macho Sprague-Dawley [67]. Otros estudios en ratas, hallaron que el Ca obtenido a partir de cáscara de huevo en polvo tiene una alta biodisponibilidad en comparación con el carbonato de Ca disponible comercialmente [75].

Un estudio comparó los efectos de la suplementación con Ca proveniente de la cáscara de huevo y el carbonato de Ca comercial en ratas ovariectomizadas, hallando

que la densidad ósea lumbar fue mayor en el primer grupo [76].

Schaafsma y Pakan (1999) mostraron un aumento de la densidad mineral ósea en la columna lumbar, fémur proximal total y trocánter en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis que recibieron polvo de cáscara de huevo con suplementos de vitamina D3 y magnesio [77].

Se ha demostrado que el Ca de la cáscara de huevo es más soluble y tiene mayor capacidad de absorción y disponibilidad que el carbonato de Ca. Estudios clínicos y experimentales demostraron que el polvo de cáscara de huevo tiene efectos positivos sobre el hueso y el cartílago y que es adecuado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis [78]. Además, las proteínas de la cáscara de huevo mejoran la absorción de Ca; observándose que el transporte de Ca a través de cultivos en monocapa de células Caco-2 aumentó un 64% en presencia de proteínas solubles de la matriz de la cáscara de huevo [79].

Otros estudios desarrollaron nuevas formas de administrar Ca a partir de la cáscara de huevo como son comprimidos [80], el uso de polvo de cáscara de huevo de tamaño nanométrico para la fortificación con Ca de yogures de leche de vaca, búfalo y kéfir [81,82].

### **1.2.5.2 Alimentos fermentados: kéfir**

Los alimentos fermentados son alimentos que se han producidos desde el desarrollo de las civilizaciones [83]. La creencia popular de que los productos fermentados tienen efectos beneficiosos para la salud data desde la antigüedad, pero solo en las últimas décadas estas ideas han comenzado a encontrar apoyo científico. Actualmente los alimentos fermentados han recuperado valor en dietas occidentales debido a los avances científicos en la importancia de una microbiota intestinal saludable. Varios grupos han sugerido que los alimentos fermentados deben incluirse

como parte de las recomendaciones dietéticas [84,85].

El kéfir es un alimento fermentado originario del Cáucaso que se transmite de generación en generación. La elaboración de kéfir fue durante mucho tiempo un secreto ya que los musulmanes del Cáucaso creían que el fermento utilizado tenía características benéficas y los mantenía fuertes [36].

El kéfir es una bebida fermentada artesanal constituida por una simbiosis de bacterias y levaduras [86], pudiendo realizarse la fermentación en distintas matrices alimentarias: leche, agua con sacarosa, denominándose kéfir de leche y kéfir de agua, respectivamente. El kéfir de agua puede elaborarse, además, con frutas o vegetales [87].

El kéfir se caracteriza por el sabor propio de la levadura y por su efervescencia. Los principales productos de la fermentación del kéfir son ácido láctico, etanol y dióxido de carbono y, en menor cantidad, se pueden encontrar compuestos como diacetilo, acetaldehído, acetato y aminoácidos. Los gránulos de kéfir se componen de microorganismos inmovilizados en una matriz de polisacáridos y proteínas llamada kefiran, donde varias especies de bacterias y levaduras coexisten en asociación simbiótica. Esta población ofrece la síntesis de metabolitos bioactivos, que son esenciales para el crecimiento del gránulo y la inhibición de otros microorganismos, como patógenos alimentarios y contaminantes [88].

El kéfir es un producto inestable microbiológicamente, por esta razón su producción es sólo casera y no industrial, ya que se puede correr el riesgo de que la fermentación no sea siempre uniforme y estable a lo largo del tiempo [89]. Los métodos de producción de kéfir, el tiempo, la temperatura de fermentación, el tipo de sustrato utilizado, el origen de los gránulos, la proporción gránulos: sustrato y el tiempo de enfriamiento posterior a la fermentación son factores que influyen en la

composición química y microbiológica del kéfir. Por lo tanto, cada kéfir tiene una composición única [90].

El kéfir es capaz de cambiar su relación bacterias/levaduras, incluso sus cepas microbianas, como consecuencia del tiempo, las condiciones experimentales, la temperatura o microorganismos vecinos en el interior del grano. Un consorcio típico parece consistir en bacterias productoras de ácido láctico, levaduras promotoras de la fermentación alcohólica, junto con algunas bacterias productoras de ácido acético. A pesar de la gran diversidad microbiana en muestras de kéfir de diferentes regiones, existen cepas comunes. Las cepas más probables que se encuentran en el kéfir son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Kluyveromyces* y *Acetobacter* [91].

El CAA en el apartado de Leches Fermentadas, Artículo 576 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)[88] define al kéfir como “*cuya fermentación se realiza con cultivos ácidolácticos elaborados con granos de kéfir, Lactobacillus kéfir, especies de los géneros Leuconostoc, Lactococcus y Acetobacter, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kéfir están constituidos por levaduras fermentadoras de la lactosa (Kluyveromyces marxianus) y levaduras no fermentadoras de la lactosa (Saccharomyces omnisporus, Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces exiguus), Lactobacillus casei, Bifidobacterium spp. y Streptococcus salivarius subsp.termophilus)*”. Debe contener como mínimo  $10^4$  Unidades Formadoras de colonia (UFC)/mL de levaduras y  $10^7$  UFC de bacterias ácido lácticas (BAL) [89]. Vale aclarar que existe regulación para el kéfir de leche pero no para el kéfir de agua. Sin embargo, en Argentina no se encuentra disponible ningún producto comercial de kéfir registrado por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, esto puede deberse a la dificultad de escalar la producción de kéfir a nivel industrial manteniendo sus propiedades

químicas y microbiológicas constantes [92].

El Ministerio de Producción y Trabajo de la Nación lanzó la ficha 39 sobre la promoción del consumo de kéfir de leche, dando a conocer las ventajas de su consumo y explicando la forma de preparación y opciones para incluir en la alimentación diaria de la población (Secretaría de agroindustria de Argentina, 2015).

El kéfir está compuesto por una gran diversidad de microorganismos benéficos y compuestos bioactivos producidos durante la fermentación, pudiendo considerarse un potencial alimento funcional [94].

El kéfir de leche tiene numerosos beneficios para la salud, como propiedades antiestrés, inmunomodulación [95], hipocolesterolémico [96], antialérgico [97], propiedades antiasmáticas, antimicrobianas [98], anticancerígenas [99] y de quimiopreención contra el cáncer de colon [100]. Es el alimento fermentado más comúnmente investigado en términos de su impacto en la salud gastrointestinal, con evidencias que sugieren que es beneficioso para la malabsorción de lactosa y la erradicación de *Helicobacter pylori*. Sin embargo, el conocimiento detallado de la composición de kéfir es aún escaso y necesita ser caracterizado para la comprensión de los efectos fisiológicos *in vivo* y para encontrar nuevas aplicaciones. Es necesario que se realicen más estudios en modelos animales y humanos que demuestren una clara causa y efecto del kéfir y la reducción del riesgo de enfermedad [94].

Si bien el sustrato más utilizado y estudiado para la elaboración de kéfir es la leche, también existen granos de kéfir de agua, cuyo sustrato fermentativo puede ser azúcar o frutas [101]. Este es un aspecto beneficioso para la industria alimentaria, ya que el mercado de consumo de bebidas no lácteas ha aumentado en los últimos años. Este mercado está destinado a consumidores con intolerancia a la lactosa, alergias a productos lácteos, dietas vegetarianas, así como a personas que tienen

comportamientos ecológicos (que son consumidores que buscan productos con menor impacto ambiental, generalmente de origen no animal) [102,103]. Actualmente, la investigación sobre el kéfir de agua es limitada y la mayor parte de la información científica disponible se refiere a la diversidad de sus especies.

### 1.2.5.3 Frutas cítricas

Los principales azúcares de las frutas cítricas son sacarosa, glucosa, fructosa y pequeñas cantidades de galactosa. Los cítricos contienen alto contenido de vitamina C y de vitamina A en forma de carotenoides provitamínicos. La vitamina C se encuentra principalmente en la corteza, encontrándose alrededor de un 25% en el endocarpio de la fruta. Además, los cítricos aportan ácido fólico en el jugo, que es una vitamina hidrosoluble. El ácido orgánico que más abunda en estas frutas es el ácido cítrico, seguido del ácido málico. Durante el proceso de maduración, mientras la cantidad de azúcares aumenta, disminuye la cantidad de los ácidos (especialmente el ácido cítrico). Se recomienda consumir dos a tres frutas por día, de las cuales, al menos una debe ser cítrica [104].

Parte de la composición química de las frutas cítricas se puede ver en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Composición química de frutas cítricas en 100 g

Fruta	Energía (kcal)	Azúcares (g)	Fibra (g)	Sodio (mg)	Calcio (mg)
Limón	29	2	2.8	2	26
Naranja	47	9	2.4	0	40
Mandarina	53	10	1.8	2	37
Pomelo	32	6	1.1	0	12

*Adaptada de [32].*

Las frutas cítricas son el principal grupo de especies dentro de la fruticultura nacional. Representan alrededor del 50% del total de frutas del país. El noroeste argentino se especializa en la producción de limón (principal cítrico producido en la Argentina que representa el 47% del total de cítricos) y, en menor medida, de pomelo (5% de la producción de cítricos). El noreste argentino, por su parte, se especializa en el cultivo de cítricos dulces: naranja y mandarina (33% y 15%, respectivamente). El objeto de la producción de cítricos es la fruta en fresco. El destino es mayoritariamente el mercado doméstico (60%), representando la exportación cerca del 15% del volumen producido de naranja y mandarina. El consumo interno aparente de naranja fue de 13.2 kg/hab/año y de mandarina 5.2 kg/hab/año en el año 2014.

Entre los cítricos, la producción de naranja constituye alrededor del 54.84% de la producción mundial total, seguida de la mandarina con el 24.70%; finalmente, el 20.44% restante corresponde a la suma de limón y lima (13.97%) y pomelo (6.47%) [105].

## 2 Objetivos

### **Objetivo general**

Estudiar la biodisponibilidad de Ca y evaluar sensorialmente una bebida desarrollada en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo.

### **Objetivos específicos**

1. Estandarizar el mecanismo de preparación de una bebida en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo.
2. Determinar la biodisponibilidad de Ca de la bebida estandarizada.
3. Evaluar el efecto de la bebida sobre el esmalte dental.
4. Evaluar la calidad microbiológica de la bebida.
5. Evaluar la aceptabilidad de consumo de la bebida en seres humanos.
6. Evaluar y describir el perfil de los consumidores de kéfir.

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Objetivo 1. Estandarizar el mecanismo de preparación de una bebida en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo

##### 3.1.1 Selección de frutas

Con el objetivo de seleccionar una fruta para el desarrollo de la bebida, se evaluó el jugo proveniente de frutas cítricas. Los motivos de esta selección fueron: fácil manejo para su extracción de jugo, su acidez natural y su accesibilidad. Para ello se obtuvieron jugos de mandarina, naranja, pomelo y limón con una exprimidora eléctrica, a los cuales se les midió las siguientes variables: pH, acidez titulable, conductividad eléctrica e hidratos de carbono (glucosa y fructosa).

##### 3.1.2 Optimización de preparación de la bebida

##### 3.1.3 Origen de los materiales

Para desarrollar la bebida se utilizaron los siguientes ingredientes con sus respectivos procedimientos.

###### *Cáscara de huevo*

La cáscara de huevo fue provista por miembros del laboratorio. Se secó y se procesó mecánicamente usando un molino mezclador (Retsch GmbH, MM200, Haan, Alemania) durante 20 min a una frecuencia de  $30 \text{ s}^{-1}$  como método estándar. Luego se esterilizó el polvo de cáscara de huevo de gallina en un autoclave esterilizador automático (Microclave SL 9000, Buenos Aires, Argentina) durante 15 min a  $134 \text{ }^\circ\text{C}$ .

###### *Jugo de naranja*

Las naranjas utilizadas en este estudio fueron adquiridas en una verdulería de la

zona microcentro de la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). El jugo fue extraído a través de una juguera eléctrica, con previa higienización y sanitización, y recolectado en tubos estériles.

### *Gránulos de kéfir*

Los gránulos de kéfir fueron obtenidos de una persona, quien realiza fermentación de kéfir de agua para consumo personal. Los mismos fueron conservados a -18 °C hasta su utilización.

### *Agua potable*

Se utilizó agua potable de la zona microcentro de Rosario. Se realizó un análisis de calidad por el Centro Universitario de Estudios Medioambientales, Universidad Nacional de Rosario (Anexo 8.1).

### **3.1.3.1 Ensayo 1**

Se evaluó la influencia de diversos factores sobre el proceso de disolución de la cáscara de huevo y la concentración de Ca de la bebida generada. Para ello se realizó un diseño factorial para determinar la condición óptima para cada uno de los factores evaluados: cantidad de cáscara de huevo, tiempo y temperatura. Se utilizaron cantidades crecientes de cáscara de huevo con tres temperaturas diferentes, dejando fija la cantidad de jugo y de kéfir. Se prepararon soluciones con 200 mL de exprimido de naranja, 10 g de kéfir y 800 mL de agua potable con distintas cantidades de cáscara de huevo: 0, 0.5, 2.5, 4 y 6 g. Como controles se prepararon 3 tubos: uno con kéfir sin cáscara, otro con jugo y cáscara (0.5 g) y otro con jugo solamente. Las muestras fueron incubadas durante 72 h y el experimento se repitió a 3 temperaturas: 8, 12 y 20 °C. Fueron establecidos los tiempos 0, 24, 48 y 72 h para la medición del pH y Ca de las muestras. Por el número de niveles y factores, el diseño factorial completo consistió en 15 unidades experimentales.

Las cantidades expresadas en g se midieron con una balanza Mettler de apreciación 0.0001 g, lo que determinó que el mayor error relativo del experimento fuera del 0.05%, ampliamente aceptable en función del resto de las mediciones. Los volúmenes fueron medidos con pipetas y propipetas con un error relativo inferior al 1%.

### **3.1.3.2 Ensayo 2**

Se realizó un nuevo diseño factorial para determinar si la cantidad de jugo (200, 500 y 1000 mL), la cantidad de kéfir (10 y 20 g) y el tiempo (0, 24, 48 y 72 h) influyen en la concentración de Ca de la bebida, utilizando 6 g de cáscara de huevo y a una temperatura de fermentación de 20 °C. Todas las muestras tuvieron un volumen final de 1000 mL utilizando como diluyente agua potable.

### **3.1.3.3 Ensayo 3**

Con el propósito de evaluar el consumo de los hidratos de carbono presentes en la bebida (correspondientes al jugo de naranja) debido al proceso fermentativo del kéfir, se midió el contenido de sacarosa, realizando una hidrólisis previa. Se midieron los monosacáridos provenientes de la hidrólisis de éste disacárido: glucosa y fructosa.

### **3.1.4 Mediciones realizadas**

Las mediciones químicas se llevaron a cabo siguiendo protocolos operativos estandarizados. Las mediciones se realizaron por duplicados bajo un estricto control de calidad. Se rechazó el valor de una muestra cuando el coeficiente de variación excedió el 10%. Simultáneamente, se procesaron soluciones de control de calidad de concentración conocida, si las unidades de desviación estándar estaban fuera del rango [-2, 2], se repetía la medición de todo el lote de muestras.

### 3.1.4.1 Medición de Ca

La concentración de Ca en las diferentes muestras se midió utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Arolab MK II. Las muestras se diluyeron 1/50, fijando la concentración de SrCl<sub>2</sub> 2% para eliminar sustancias que pudieran interferir en la medición. Se utilizó una curva de calibración con concentraciones de Ca 0-50 µg/mL y la llama utilizada se obtuvo por mezcla de acetileno: aire en proporción 1.5:1. Luego de evaluar los errores sistemáticos y aleatorios se calculó la concentración de Ca en cada muestra, expresándola en mg/L.

### 3.1.4.2 Medición de hidratos de carbono

Con el propósito de evaluar el consumo de los hidratos de carbono presentes en la bebida (correspondientes al jugo de naranja) debido al proceso fermentativo del kéfir, se midió el contenido de sacarosa, realizando una hidrólisis previa. Se midieron los monosacáridos provenientes de la hidrólisis de éste disacárido:

- *Medición de glucosa:* se utilizó el Kit de Glicemia (Wiener Lab, Rosario, Argentina) y se midió por técnica espectrofotométrica a 505 nm. Luego se calculó la concentración de glucosa en g/L.
- *Medición de fructosa:* se utilizó un Kit compuesto por: estándar de fructosa 5 g/L, HCl 30% y resorcinol 0.1%. La reacción ocurrió a 80 °C. Se midió por técnica espectrofotométrica a 406 nm. Luego se calculó la concentración de fructosa en g/L [106].

### 3.1.4.3 Medición de pH

El pH se midió con un pH-metro Metrohm E 632. Para la calibración se utilizaron buffers de pH 7 y 4 para medidas de pH menores a 7 y buffers de pH 7 y 9 para medidas mayores.

### 3.1.4.4 Medición de conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se midió con un conductímetro Hanna 430. Los valores se expresaron en mS/cm.

### 3.1.4.5 Medición de acidez titulable

Se realizó por titulación de un volumen de la solución en estudio (2 mL) con NaOH 0.1 M. El agregado de NaOH se realizó hasta alcanzar pH=7, valor que fue controlado con un pH-metro. Con el volumen de NaOH gastado, la concentración del mismo y el volumen de la solución de NaOH se calcularon los mEq de NaOH gastados/L de solución en estudio. Este último valor representa la acidez titulable.

### 3.1.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos se analizaron con bibliotecas del programa R, versión 3.6.2 [107]. El diseño factorial se analizó con ANOVA y modelos lineales. El análisis de las componentes principales (PCA) se realizó con la biblioteca *FactoMineR*. Cuando se compararon los valores de más de dos grupos se utilizó ANOVA para dos criterios y las diferencias entre los grupos se analizaron con el Test LSD con corrección de Bonferroni de la biblioteca *Agricolae*.

## **3.2 Objetivo 2. Determinar la biodisponibilidad de calcio de la bebida estandarizada**

### **3.2.1 Absorción intestinal de calcio**

La absorción intestinal de Ca es un proceso que ocurre principalmente en el intestino delgado [36]. Se evaluó la absorción de Ca de la BEBIDA a través de un modelo *ex vivo* de sacos de intestino delgado evertidos [86].

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas hembras Sprague Dawley de 180-220 g de peso corporal. Las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Rosario (Argentina). Los mismos fueron alimentados con alimento balanceado para roedores (Gepsa, Argentina) y agua *ad libitum*. Antes de los experimentos, las ratas fueron cuidadas en un ambiente con temperatura controlada de 23-25 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12h-12h y flujo de aire filtrado en el intervalo de tiempo programado.

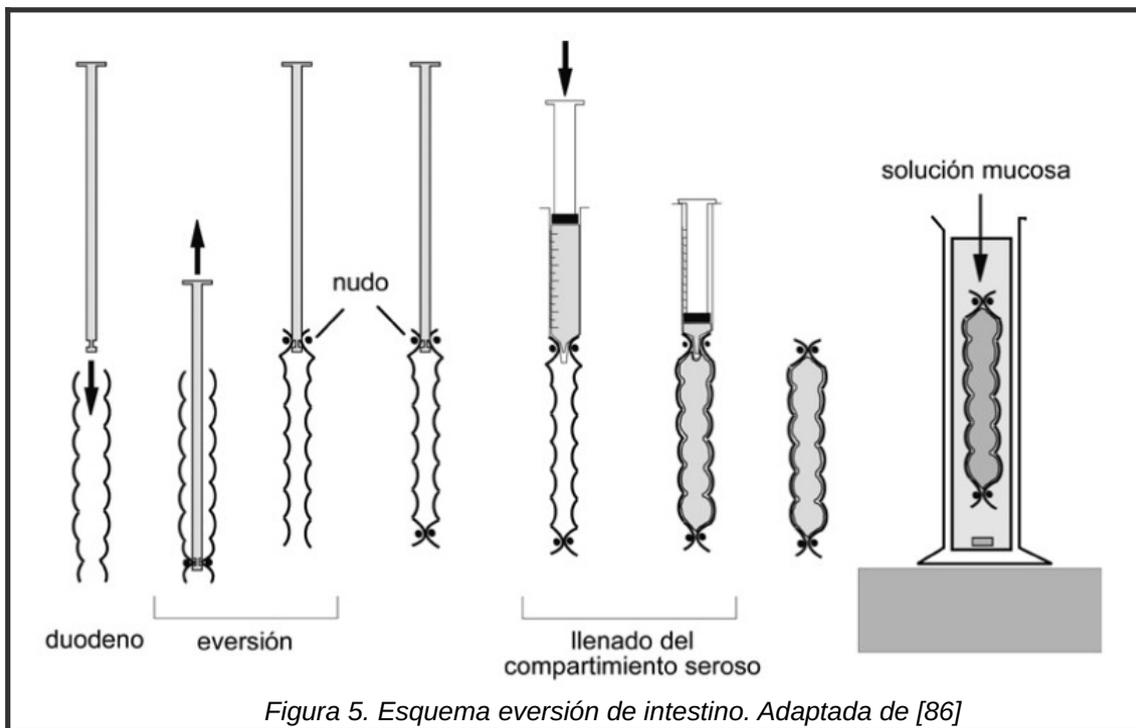
El cuidado de los animales y los experimentos realizados se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices internacionales para el cuidado de los animales [87] y este trabajo ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (resolución C.D. N° 2162/2017).

#### **3.2.1.1 Preparación de sacos intestinales evertidos**

Luego de la eutanasia de las ratas por inhalación con CO<sub>2</sub>, el intestino delgado fue removido, evertido y enjuagado con solución de NaCl 9 g/L.

Para evertir al intestino primero se introdujo un émbolo de aguja de 1 mL dentro del intestino. Se ató un nudo entre el émbolo y el intestino y, se retiró el émbolo, dejado atado al intestino. Dicho procedimiento está representado en la Figura 5. Luego

se dividió el intestino evertido en 4 segmentos de tamaño similar.



La superficie serosa de los sacos intestinales evertidos se expuso a la siguiente solución:

- Solución interna: Tris 1 mM,  $MgCl_2$  1 mM, glucosa 160 mM,  $\gamma$ -glicerofosfato 100 Mm, pH= 9.

La superficie mucosa se expuso a las siguientes soluciones según los tratamientos estudiados:

- BEBIDA: como se indica en el apartado 4.1.3.
- Control 1: agua +  $CaCl_2$ .
- Control 2: jugo de naranja +  $CaCl_2$ .

Se utilizó  $CaCl_2$  de grado analítico como control porque tiene una alta biodisponibilidad ( $\geq 90\%$ ). Todas las soluciones fueron preparadas y ajustadas para tener la misma concentración (600 mg Ca/L).

Cada saco fue llenado con 0.5 mL de solución interna y se colocaron 4 de éstos

en un volumen de solución externa de 25 mL, con una relación mucosa/serosa de aproximadamente 10, de modo que la concentración de Ca en la solución mucosa permaneció constante durante todo el experimento. Los experimentos se realizaron a 37 °C durante 30 min y se obtuvieron muestras del compartimento seroso al final del período de incubación. La tasa de absorción de Ca ( $\mu\text{g Ca/min}$ ) se determinó con el volumen y la concentración de Ca del compartimento seroso y la duración del experimento. La concentración de Ca serosa se midió por espectroscopía de absorción atómica, de acuerdo a lo detallado en el apartado 3.1.4.1.

### **3.2.1.2 Análisis estadístico**

Cuando se compararon los valores de más de dos tratamientos se utilizó ANOVA a dos criterio y las diferencias entre los grupos se analizó con el test de comparaciones múltiples, LSD.

### **3.3 Objetivo 3. Evaluar el efecto de la bebida sobre el esmalte dental**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la BEBIDA sobre el proceso de desmineralización-rem mineralización del esmalte dental, se realizó un diseño experimental utilizando dientes bovinos recién extraídos, los cuales se obtuvieron de animales sacrificados en el matadero CTC de Puerto Vilelas (Chaco, Argentina). En este estudio se incluyeron dientes libres de caries y defectos del esmalte de bovinos que no tuvieron más de 3 años.

Las coronas se pulieron con un cepillo circular con cerdas de nailon montadas en una pieza de mano y luego se enjuagaron con agua destilada. Los dientes se sumergieron en formalina al 5% durante una semana a 4 °C. Se realizó una sección transversal a la altura del cuello del diente para separar la porción coronal de la raíz con una hoja de diamante montada en la pieza de mano con abundante corriente de agua fría y constante. El área cervical, el área de corte y el conducto de la porción coronal se cubrieron con barniz resistente al ácido, dejando solo el tejido adamantino expuesto. Las coronas se almacenaron en solución salina hasta el momento del uso.

Las muestras se dividieron al azar en 4 grupos (n=20, 5 por grupo) y se utilizó una adaptación del método propuesto por Ferrazzano para producir erosión del esmalte [88]. Cada corona se sumergió en un volumen de solución según el tratamiento y se ajustaron los mL según su peso, guardando la relación 0.1 mL de solución/g de corona. Los tubos se mantuvieron a 4 °C durante 72 h y al final del ensayo se realizaron mediciones en los dientes y en las soluciones de tratamiento.

Se evaluaron los siguientes tratamientos y soluciones:

- Saliva artificial: control negativo de desmineralización con la siguiente composición:  
p-hidroximetilbenzoato (2.00 g/L), carboximetilcelulosa sódica (10.0 g/L), KCl (8.38 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (0.29 mmol/L), CaCl<sub>2</sub> (1.13 mmol/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4.62 mmol/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

(2.40 mmol/L), pH 7.2.

- Ácido láctico: control positivo de desmineralización, cuya composición fue: ácido láctico 0.1 M y carboximetilcelulosa sódica (10.0 g/L), pH 4.5.
- Control bebida: BEBIDA sin kéfir.
- BEBIDA: como se indica en el apartado 4.1.3.

El pH de BEBIDA y control bebida se ajustó a 4.5, de manera de igualar el valor de pH del ácido láctico.

Antes y después de los tratamientos, las muestras se secaron hasta peso constante a 30 °C. Cada muestra se pesó antes y después del tratamiento con las distintas soluciones, utilizando una escala de alta precisión de estimación de 0.1 mg (Mettler, Suiza). La concentración de Ca en las soluciones tratamiento se midió al inicio y al final del ensayo, mediante espectroscopía de absorción atómica, como fue detallado en el apartado 3.1.4.1. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  de Ca liberado durante el experimento.

### 3.3.1 Análisis cuantitativo

El proceso de desmineralización-rem mineralización se analizó utilizando la relación entre el peso final/peso inicial, que denominamos razón de desmineralización (R). El valor de R se interpreta de la siguiente manera:  $R=1$  indica que no hubo predominio de la desmineralización por sobre la rem mineralización;  $R>1$  indica mayor rem mineralización;  $R<1$  indica predominio del proceso de desmineralización. La concentración de Ca fue analizada con la diferencia entre tiempo final e inicial; un valor positivo se interpretó como predominio del proceso de desmineralización sobre la rem mineralización.

### **3.3.2 Análisis cualitativo**

Se obtuvieron imágenes con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Física Rosario, CONICET. Se analizó 1 muestra de cada grupo.

Se colocaron las muestras en platinas con el lado vestibular hacia arriba y se metalizaron con una fina capa de oro, mediante metalización eléctrica (Sputtering Denton Vacuum Desk II, Moorestown, Estados Unidos) y se observaron por SEM (JEOL JEOL 5800LV. Tokio, Japón- Microscopía electrónica Servicio-UNNE). Las imágenes se capturaron digitalmente con una ampliación de 1000x y 3000x (Digitalizador Gatan modelo 788 Digiscan II Pleasanton, Estados Unidos).

### **3.3.3 Análisis estadístico**

La distribución de probabilidad de los datos se analizó con la prueba de Shapiro Wilk y la homocedasticidad de los datos se evaluó con la prueba de Bartlett. En todos los ensayos se utilizó un nivel de significación de 0.05. Para comparar variables numéricas entre tres o más grupos se utilizó la prueba de ANOVA o Kruskal Wallis, según corresponda. Las diferencias individuales entre los grupos se evaluaron con un test de comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni.

### **3.4 Objetivo 4. Evaluar la calidad microbiológica de la bebida**

#### **3.4.1 Ensayos microbiológicos**

Con la finalidad de evaluar la calidad microbiológica de la BEBIDA se realizaron los siguientes ensayos, siguiendo la normativa que exige el CAA, capítulo VIII [89]. Cabe aclarar que no existe una normativa para el kéfir de agua y por lo tanto nos basamos en la normativa para el kéfir de leche.

Todos los experimentos fueron realizados con doble mechero Bunsen o bajo campana, empleando material esterilizado, con previa y posterior desinfección del espacio de trabajo.

##### **3.4.1.1 Muestra**

Las muestras analizadas microbiológicamente fueron:

- BEBIDA: preparada de acuerdo al apartado 4.1.3 y conservada entre 4 y 8 °C previo a su utilización. Las pruebas fueron realizadas el mismo día de su filtración.
- Gránulos de kéfir: los mismos fueron recolectados posterior a la fermentación de la BEBIDA y recolectados en tubo estéril. Se conservaron entre 4 y 8 °C previo a su utilización en los ensayos microbiológicos.

##### **3.4.1.2 Preparación de diluciones**

Se realizó la técnica de diluciones seriadas.

- BEBIDA: se colocaron 10 mL de la BEBIDA en un erlenmeyer estéril y se agregaron 90 mL de agua peptonada 0.1% (dilución 1/10). Luego, se realizaron diluciones sucesivas 1/10<sup>2</sup> y 1/10<sup>3</sup>. En caso de resultar necesario, se realizaron

diluciones mayores a la  $1/10^3$ .

- Gránulos de kéfir: en un erlenmeyer estéril se colocaron 10 g de gránulos de kéfir y se agregaron 90 mL de agua peptonada 0.1% (dilución  $1/10$ ). Se continuó con las diluciones sucesivas  $1/10^2$  y  $1/10^3$ . En caso de resultar necesario, se realizaron diluciones mayores a la  $1/10^3$ .

La BEBIDA, los gránulos de kéfir y sus respectivas diluciones se utilizaron para ensayos que se detallan a continuación.

### **3.4.1.3 Método de screening: búsqueda de microorganismos**

Para una primera aproximación de la composición microbiológica, se realizó la técnica de aislamiento y recuento de hongos de alimentos por diluciones sucesivas, utilizando Agar Plate Count (APC).

Se sembraron en superficie 100  $\mu$ l de las diluciones en APC mediante espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días, con controles cada 24 h.

A las colonias crecidas en APC se les realizó un examen directo al microscopio con azul de lactofenol.

### **3.4.2 Ensayos micológicos**

Con el objetivo de caracterizar la carga fúngica presente en la BEBIDA y en los gránulos de kéfir se realizaron los siguientes ensayos.

#### **3.4.2.1 Recuento de hongos filamentosos y levaduriformes**

Para el recuento de la carga fúngica presente en la BEBIDA y en los gránulos de kéfir, se utilizó agar Sabouraud Glucosa (SG), que es un medio utilizado para aislamiento, identificación y conservación de hongos filamentosos y levaduriformes.

Se sembraron 100  $\mu$ l de las diluciones obtenidas, como se explica en el apartado

3.4.1.2, en superficie con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron en aerobiosis a 28 °C durante 5 a 7 días realizando controles cada 24 h. Se realizó el recuento de las colonias fúngicas obtenidas y se informó en UFC/mL y UFC/g de muestra. Además, se observaron las características típicas de las colonias crecidas y se subcultivaron en medios apropiados para su identificación (Método de ensayo FIL 94B:1990).

### **3.4.2.1.1 Microscopía óptica**

El estudio micromorfológico de las colonias fúngicas se realizó por microscopía óptica. Para ello se realizó el examen directo de una porción de las colonias crecidas con azul de lactofenol, colorante que tiñe de azul las estructuras fúngicas hialinas, facilitando su observación. Se empleó un microscopio con aumento de 400x y 1000x, usando aceite de inmersión para este último. Además, se realizó la tinción de Gram-Nicolle de las colonias crecidas en SG, como se describe en el apartado 8.3.

### **3.4.2.2 Identificación presuntiva de levaduras**

Con el fin de realizar una identificación presuntiva de las levaduras aisladas, se empleó el medio cromogénico CHROMagar™-*Candida* (CHROMagar, Pairs, Francia), medio que se utiliza para el aislamiento y la identificación presuntiva de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei* anteriormente) [108].

Se preparó una suspensión en solución fisiológica estéril, representativa del desarrollo obtenido y homogénea, a partir de las colonias crecidas en SG. Se sembró mediante técnica de estriado con ansa, una alícuota de dicha suspensión sobre una placa de Petri conteniendo el medio CHROMagar™-*Candida* y se incubó a 37 °C durante 72 h. Luego se observaron las características de las colonias de levaduras desarrolladas, poniendo énfasis en el color que presentaron (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características de levaduras

Levadura	Aspecto de las colonias
<i>Candida albicans</i> / <i>Candida dubliniensis</i> (complejo <i>Candida albicans</i> )	Colonias color verde
<i>Candida tropicalis</i>	Colonias color azul
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Colonias rosas, secas y rugosas
Otras especies de <i>Candida</i>	Colonias color blancas/ rosas húmedas

Adaptada de [108].

### 3.4.2.3 Búsqueda de clamidoconidias

Se seleccionó una colonia aislada levaduriforme, crecida sobre CHROMagar™-*Candida*, para estudiar su desarrollo en medio Agar Leche (AL). El AL es un medio natural que estimula la producción de formaciones fúngicas, como los clamidoconidios, que aportan información para la identificación de levaduras. En este medio se puede observar la formación de blastoconidios (levaduras brotadas) y/o pseudomicelios y además, si la especie en estudio es *Candida albicans* o *dubliniensis* se puede observar la formación de clamidoconidios terminales (estructuras de resistencia) a las 48 h de incubación a 28 °C [108].

Se sembró la levadura aislada realizando tres estrías paralelas con una separación de 5 mm aproximadamente y con un largo mayor a 20 mm. Se colocó un cubreobjetos previamente flameado y enfriado. Se incubó a 28 °C durante 48 h. Luego se observaron las características micromorfológicas del desarrollo y se describió la presencia de elementos levaduriformes, pseudomicelios y clamidoconidios bajo microscopio.

### 3.4.2.4 Identificación definitiva de levaduras

La identificación de las levaduras se realizó mediante la técnica de ID 32C

(BioMérieux S.A, Francia), un sistema estandarizado de identificación de levaduras, que consiste en una galería compuesta por 32 pocillos que contienen carbohidratos deshidratados como sustrato. En función de las fuentes de carbohidratos que el microorganismo en estudio es capaz de asimilar, se obtiene un bionúmero, el cual es ingresado en el software provisto por el fabricante del equipo, alcanzando la identificación definitiva.

Se trabajó con cultivos jóvenes (24-48 h) de la levadura en estudio, previamente aislada en CHROMagar™-*Candida*. Se preparó una suspensión de turbidez similar al tubo N°2 de la Escala de Mc Farland en un tubo de ensayo con 2 mL de agua destilada estéril y se homogeneizó empleando vortex. En una ampolla de API C Medium provista por el kit, se transfirieron 250 µl de la suspensión anterior. Se homogeneizó y se utilizó de inmediato. Se inocularon 135 µl de la suspensión en cada pocillo de la galería y se incubó a 28 °C durante 24-48 h.

En primer lugar se analizó que el control negativo (pocillo sin ningún azúcar-0) no presentara turbidez y que el control positivo (pocillo con glucosa-GLU) evidenciara turbidez debido al desarrollo microbiano. Luego, se registraron los pocillos que presentaron turbidez como positivas para la asimilación del azúcar. Las reacciones obtenidas se codificaron en un perfil numérico. En la hoja de resultados, los ensayos se separaron en grupos de 3 y se asignó a cada uno un valor de 1, 2 ó 4. Se sumaron en cada grupo los valores que correspondieron a las reacciones positivas, obteniendo así un código de 10 dígitos. Solamente el último ensayo (ESC: esculina) no está codificado y se leyó según demanda del programa en caso de ser necesario.

### **3.4.3 Ensayos bacteriológicos**

Con el objetivo de caracterizar la comunidad bacteriana cultivable presente en la BEBIDA y gránulos, a continuación, se describen los ensayos realizados.

#### **3.4.3.1 Recuento de mesófilos aerobios viables**

El agar Plate Count (APC) es un medio de cultivo recomendado para el recuento de microorganismos aeróbicos en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos.

Se sembraron en profundidad 0.1 mL de cada dilución en placas con APC. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego se realizó el recuento de las UFC en aquellas placas de Petri que tuvieron entre 30 y 300 UFC. El recuento de mesófilos aerobios totales se informó en UFC/mL y UFC/g de muestra (Método de ensayo FIL 100:A 1987).

#### **3.4.3.2 Recuento de bacterias coliformes totales**

Para esta determinación se utilizó agar Violeta Rojo Bilis Lactosa (AVRB-L). Se sembraron 0.1 mL de las diluciones  $1/10^1$ ,  $1/10^2$  y  $1/10^3$  en placas conteniendo al mencionado medio de cultivo mediante siembra en superficie con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se realizó el recuento de las UFC en aquellas placas de Petri que tuvieron entre 30 y 300 UFC. El recuento de coliformes totales se informó en UFC/mL y UFC/g de muestra (Método de ensayo FIL 73A: 1985).

#### **3.4.3.3 Recuento de bacterias coliformes fecales**

Se sembraron 0.1 mL de las diluciones  $1/10^1$ ,  $1/10^2$  y  $1/10^3$  en placas con agar LEVINE mediante siembra en superficie, empleando espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 44 °C durante 24 h. Se realizó el recuento de las UFC en aquellas placas de Petri que tuvieron entre 30 y 300 UFC. La cuantificación se informó en UFC/mL ó UFC/g de muestra. En caso de observarse colonias sospechosas de *Escherichia coli* se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas metabólicas:

hidrólisis de la urea, triple azúcar hierro (TSI), agar hierro lisina (LIA), sulfhídrico-indol-movilidad (SIM), agar citrato y caldo Voges-Proskauer (VP) (Método de ensayo APHA 1992 Cap. 24).

### 3.4.3.4 Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Se sembraron 0.1 mL de las diluciones  $1/10^1$ ,  $1/10^2$  y  $1/10^3$  en placas conteniendo agar Baird-Parker (BP) mediante siembra en superficie, empleando espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se realizó el recuento de las UFC en aquellas placas de Petri que tuvieron entre 30 y 300 UFC. La cuantificación se informó en UFC/mL y UFC/g de muestra. A las colonias de color negro grisáceo con actividad lecitinásica, sospechosas de *Staphylococcus aureus*, se les realizó la coloración de Gram-Nicolle y las pruebas bioquímicas catalasa y DNasa (Anexo 8.4). En paralelo, se procesó la cepa control de calidad *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Método de ensayo FIL 60A: 1978).

### 3.4.3.5 Búsqueda de *Salmonella* spp.

1. *Pre enriquecimiento*: se agregaron 25 mL de la BEBIDA en 225 mL de caldo lactosado y 25 g de los gránulos de kéfir en 225 mL de caldo lactosado. Ambos caldos se incubaron a 35 °C durante 24 h. 2. *Enriquecimiento selectivo*: se transfirieron 0.1 mL del caldo de enriquecimiento a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y 0.1 mL del caldo de enriquecimiento a 10 mL de de caldo Tetrionato (TT). Dichos caldos se incubaron a 42 °C durante 24 h. 3. *Aislamiento en medio selectivo y diferencial*: se repicaron los caldos RV y TT en tres medios selectivos y diferenciales: agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar Salmonella Shigella (SS) y en agar Verde Brillante (VB). Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Luego, se examinó el desarrollo bacteriano a fin de determinar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*. En el

caso de observarse colonias sospechosas de *Salmonella* se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas metabólicas: hidrólisis de la urea, TSI, SIM, lisina descarboxilasa y VP (Método de ensayo FIL 93A: 1985).

### 3.4.3.6 Búsqueda de BAL

Para la identificación de BAL se utilizó el medio agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS), específico para *Lactobacillus* spp. y otras BAL.

Se sembraron 100 µl de la BEBIDA y sus diluciones en agar MRS mediante espátula de Drigalsky. La incubación se realizó en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 35-37 °C durante 72 h. Se observó la morfología de las colonias crecidas en el medio MRS y se realizó el recuento de UFC. El mismo procedimiento se realizó para las diluciones de los gránulos de kéfir (Método de ensayo FIL 117A:1988).

Adicionalmente, se evaluó la presencia de las BAL en diluciones del jugo de naranja y de los gránulos de kéfir, bajo dos tratamientos térmicos:

- > Tratamiento 1: 63 °C durante 30 min.
- > Tratamiento 2: 72 °C durante 15 s.

Posterior al tratamiento térmico, las muestras se mantuvieron durante 10 min a 25 °C y 10 min entre 4 y 8 °C.

#### 3.4.3.6.1 Determinación fenotípica de actividad hemolítica

El agar sangre de carnero (ASC) permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y pone en evidencia la capacidad hemolítica de ciertas bacterias.

Las colonias crecidas en agar MRS fueron reaisladas en ASC. Dichas placas fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24-48 h. La presencia de un halo de hemólisis alrededor de las colonias crecidas permitió determinar la actividad hemolítica

de los aislados en estudio. En la Tabla 9 se muestra la clasificación del tipo hemólisis de acuerdo a las características del halo.

**Tabla 9.** Tipos de hemólisis

<b>Tipo de hemólisis</b>	<b>Característica del halo</b>
<b><math>\alpha</math>-hemólisis o hemólisis incompleta</b>	Se observa clarificación parcial del medio de cultivo alrededor de las colonias
<b><math>\beta</math>-hemólisis o hemólisis verdadera</b>	Se observa una clarificación total del medio de cultivo alrededor de las colonias
<b><math>\gamma</math>-hemólisis</b>	No se observa clarificación del medio de cultivo alrededor de las colonias

#### 3.4.3.6.2 Identificación de BAL

Para caracterizar las colonias aisladas sospechosas de BAL en el agar MRS, se realizó tinción con coloración de Gram-Nicolle y las pruebas bioquímicas metabólicas catalasa y citocromo-oxidasa. Para la identificación a nivel género y especie se utilizó la tecnología MALDI-TOF MS (por su sigla en inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*) con el equipo MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics. Inc., Billerica, MA) y empleando el sistema de identificación miniaturizado API 50 CHL (BioMerieux, Francia) según indicaciones del fabricante.

### **3.5 Objetivo 5. Evaluar la aceptabilidad de consumo de la bebida en seres humanos**

La calidad de un alimento está determinada tanto por la cantidad y calidad de los nutrientes que aporta como por su calidad en seguridad alimentaria. Sin embargo, lo que determina la aceptación o rechazo del producto depende de la percepción subjetiva del consumidor, teniendo en cuenta atributos propios del producto como color, sabor, textura, consistencia, presentación, entre otros. Por lo tanto, cuando se desarrolla un alimento resulta imprescindible evaluar el aspecto sensorial, ya que esto determinará si el producto es o no consumible por la población. En la industria alimenticia, la evaluación de las características sensoriales de los productos es percibida por los consumidores y es un componente esencial en el desarrollo, mantenimiento, optimización, mejoramiento de la calidad y evaluación del potencial de una marca particular de productos alimenticios [109].

Para evaluar la aceptabilidad de la BEBIDA desarrollada se emplearon pruebas sensoriales del tipo afectivas (u orientadas al consumidor), en las cuales el panelista expresa el nivel de agrado, aceptación y preferencia de un producto alimenticio. Para ello se realizó un test sensorial de escala hedónica de 5 puntos y una prueba descriptiva, escala JAR (por sus siglas en inglés *Just About Right*).

#### **3.5.1 Test sensorial de escala hedónica**

El test sensorial de escala hedónica mide el grado de satisfacción de un producto usando una escala de respuesta, la cual puede ser verbal o gráfica, dependiendo de la edad de los evaluadores y el número de muestras a evaluar. Se diferencian de las pruebas de aceptabilidad en que miden el grado en que agrada o desagrada un producto, no solamente si es aceptable o no. Se utilizan para estudiar en el laboratorio la posible aceptación del alimento. En ellas, se pide al consumidor

que luego de su primera impresión responda cuánto le agrada o desagrada el producto, esto lo informa de acuerdo a una escala verbal numérica que se encuentra impresa en la ficha [110].

### 3.5.2 Prueba descriptiva

Las escalas JAR son escalas que permiten evaluar la adecuación de la intensidad de los atributos sensoriales de un producto. Se utilizan con frecuencia en ciencia del consumidor, especialmente en estudios de optimización de la formulación de productos [110]. En este ensayo los atributos evaluados fueron: sabor naranja, acidez y dulzor.

La Figura 6 corresponde al formulario empleado para el ensayo sensorial.

Fecha:	Sexo:	Edad:	
Pruebe el producto que se presenta a continuación. Por favor, marque con una X el cuadrado que está junto a la frase que mejor describa su opinión sobre el producto que acaba de probar.			
<input type="checkbox"/> Me gusta mucho <input type="checkbox"/> Me gusta <input type="checkbox"/> No me gusta ni me disgusta <input type="checkbox"/> Me disgusta <input type="checkbox"/> Me disgusta mucho			
Indicar su opinión colocando una X en el casillero correspondiente.			
Sabor dulce	<input type="checkbox"/> Poco	<input type="checkbox"/> Ideal	<input type="checkbox"/> Mucho
Sabor naranja	<input type="checkbox"/> Poco	<input type="checkbox"/> Ideal	<input type="checkbox"/> Mucho
Sabor ácido	<input type="checkbox"/> Poco	<input type="checkbox"/> Ideal	<input type="checkbox"/> Mucho
¿Lo consumiría?	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	

*Figura 6. Formulario del ensayo sensorial.*

El procedimiento se desarrolló de la siguiente manera:

1. Se citó a los participantes de la prueba el día que se estipuló para la misma.

2. Se les hizo firmar un consentimiento informado (Anexo 8.5).

3. Se dispuso para cada participante un vaso con 20 mL de la BEBIDA, una lapicera y el formulario. También se ofreció un vaso con agua para enjuagar la boca antes de iniciar la prueba.

4. Se pidió que completaran el formulario luego de degustar la BEBIDA.

### 3.5.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo y un análisis de penalización para los atributos evaluados que a continuación se detalla.

#### *Análisis de penalización*

Con este análisis se puede ver si los participantes que han catalogado un atributo encima o por debajo del punto ideal, han dado una menor puntuación en la aceptación global que aquellos que afirmaron que el atributo estaba en su punto ideal. Es decir, con este método se puede ver si el hecho de que un atributo situado por debajo de “ideal” o por encima, ha “penalizado” en la puntuación de aceptación global.

El análisis se realizó para cada atributo de forma independiente y en la escala de 3 niveles empleada (poco, ideal y mucho). Se calculó la aceptación global media de cada nivel de cada atributo. Luego se calculó el valor de la penalización para el nivel “poco”, haciendo la diferencia entre la aceptación global media de dicho nivel con la aceptación global media del nivel “ideal”. De igual forma se calculó la penalización para el nivel “mucho”. Se puede considerar que el efecto del atributo en la aceptación global del producto es importante cuando el valor de penalización es mayor a 1 y cuando el porcentaje de individuos es mayor al 80%.

### **3.6 Objetivo 6. Evaluar y describir el perfil de los consumidores de kéfir**

Cuando se desarrolla un producto es importante realizar un estudio de mercado para evaluar qué público estaría dispuesto a consumirlo. Por ello, el último objetivo planteado fue evaluar el perfil de los consumidores de kéfir, uno de los ingredientes claves en el sabor de la BEBIDA.

#### **3.6.1 Diseño metodológico**

Se planteó un diseño de tipo transversal y descriptivo. El trabajo de campo se realizó mediante una encuesta diagnóstica para evaluar el consumo de kéfir en un grupo de individuos. La encuesta fue *online* y autoadministrada, diseñada a través de formularios de la *suite Google Drive Office*, distribuida por las redes sociales del laboratorio. Se analizaron dos grupos: consumidores y no consumidores de kéfir.

Las variables estudiadas fueron: sociodemográficas (edad, sexo, ocupación, ingresos mensuales), variables específicas para analizar el tipo de consumidor: tipo de alimentación (omnívora, vegetariana), procedencia de la comida (casera, comida hecha, viandas, alimentos pre-elaborados), lugar de compra (supermercado, almacén, lugares específicos —carnicería, verdulería, panadería— y dietética), horas diarias dedicadas a la preparación y consumo de alimentos —se simplificó con la frase “horas diarias alimentación”—, el consumo de kéfir (sí, no) y, variables específicas de los consumidores de kéfir (tipo de kéfir, como lo conoció, procedencia del mismo, frecuencia de consumo, causa de su consumo). Con el siguiente link se puede acceder a la encuesta: <https://forms.gle/VZZU654N7rmAXbuW7>

#### **3.6.2 Análisis estadístico**

El análisis descriptivo de los datos se realizó con el paquete *stats* del software R

y la vinculación de las variables con el análisis de las correspondencias múltiples (MCA) de la biblioteca *FactoMineR*. Para comparar la proporción entre las categorías de una variable se utilizó el test para dos proporciones o más de dos, según correspondió. Las asociaciones entre las variables se corroboraron con la prueba Chi cuadrado, con un nivel de significación de 0.05.

## 4 Resultados

### 4.1 Objetivo 1. Estandarizar el mecanismo de preparación de una bebida en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo

#### 4.1.1 Selección de fruta

La Tabla 10 muestra los valores de pH, conductividad eléctrica, acidez titulable y concentración de carbohidratos medidos para los distintos jugos provenientes de frutas cítricas.

**Tabla 10.** Variables medidas en frutas cítricas

Mediciones	Limón	Pomelo	Naranja	Mandarina
pH	2.27±0.19 <sup>c</sup>	3.09±0.38 <sup>b</sup>	3.66±0.29 <sup>a</sup>	3.89±0.36 <sup>a</sup>
Conductividad (mS/cm)	4.10±1.03 <sup>a</sup>	2.91±0.27 <sup>b</sup>	2.87±0.76 <sup>b</sup>	2.39±0.14 <sup>b</sup>
Acidez titulable (mEq/L)	555.22±275.62 <sup>a</sup>	220.24±58.74 <sup>b</sup>	109.48±43.61 <sup>c</sup>	90.55±39.66 <sup>c</sup>
Hidratos de carbono (g/L)	42.76±21.84 <sup>b</sup>	80.51±29.58 <sup>b</sup>	148.29±72.98 <sup>a</sup>	144.23±62.91 <sup>ab</sup>

*Variables medidas expresadas como media±DS. Letras diferentes entre columnas de una misma fila indica diferencia significativa. ANOVA, post test LSD ( $p < 0.05$ ).*

De todas las frutas cítricas evaluadas, se seleccionó el jugo de naranja para los siguientes experimentos, ya que proporciona la mayor cantidad de carbohidratos para la fermentación, aunque el pH no es el más bajo y la acidez titulable no es la más alta. Además, las naranjas están disponibles en todas las estaciones del año, son accesibles a la población y su jugo es de fácil obtención.

#### 4.1.2 Optimización de la preparación de la bebida

##### 4.1.2.1 Ensayo 1

El efecto de los diferentes factores (tiempo, temperatura y cantidad de cáscara de huevo) sobre la concentración de Ca de la bebida se analizó con un diseño factorial y análisis de varianza múltiple. Luego, se analizó el efecto individual de cada nivel de los diferentes factores con el coeficiente de un modelo lineal (Tabla 11). Un análisis previo rechazó la interacción entre factores.

**Tabla 11.** Coeficiente del modelo lineal propuesto para cada factor

Niveles del factor	Coeficientes (mg/L)	P-value
<i>Cáscara de huevo (g)</i>		
0	0	
0.5	56.16	0.001867
2.5	238.95	< 2e-16
4	355.79	< 2e-16
6	463.96	< 2e-16
<i>Temperatura (°C)</i>		
8	0	
12	13.89	0.387171
20	16.06	0.317904
<i>Tiempo (h)</i>		
0	0	
24	43.87	0.017572
48	82.80	1.89e-05
72	120.97	4.25e-09

*p*<0.01 indica diferencia estadísticamente significativa en la concentración de Ca según los diferentes niveles de cada factor.

Según el ANOVA, la cantidad de cáscara de huevo y el tiempo de fermentación son factores que influyen significativamente en la concentración de Ca de la bebida ( $p < 0.05$ ), no así la temperatura.

Se utilizó el siguiente modelo lineal:

$$[\text{Ca}] = a \cdot \text{cantidad.cáscara de huevo} + b \cdot \text{temperatura} + c \cdot \text{tiempo} + \text{intersección}$$

donde a, b, c e intersección son los coeficientes del modelo. El modelo ajustado con los valores experimentales tuvo un  $R^2 = 0.91$  y un valor de  $p < 0.01$ . El modelo asigna un coeficiente igual a cero para el valor más bajo de cada factor (factor de referencia). Un coeficiente positivo indica un aumento en la concentración de Ca en comparación con el nivel de referencia de cada uno.

Según el modelo lineal empleado, el tiempo de incubación (72 h) y la cantidad de cáscara de huevo (6 g) permitieron alcanzar el mayor contenido de Ca, aportando 600 mg de Ca/L. Esta concentración se logró con una cantidad escasa de carbohidratos disponibles para la fermentación. Esto sugiere que cuanto mayor sea la cantidad de carbohidratos, es probable que se obtenga una mayor concentración de Ca.

### *Análisis complementario*

Un análisis de las componentes principales (*Principal Components Analysis*, PCA) describió el efecto del tiempo, el pH, la temperatura y la cantidad de cáscara de huevo sobre la concentración de Ca. La Figura 7 muestra las variables del mapa de PCA que indican que el pH y la concentración de Ca están correlacionados positivamente, como lo indica la dirección de los vectores que representan las variables. El mapa también indica que las muestras con un pH y una concentración de Ca más altos se ubican preferentemente en el semiplano derecho, mientras que las muestras con un pH y una concentración de Ca más bajos se encuentran en el

semiplano izquierdo. Además, se realizó un análisis de las elipses, que muestra que un mayor tiempo de incubación y una mayor cantidad de cáscara permiten valores más altos de Ca y pH.

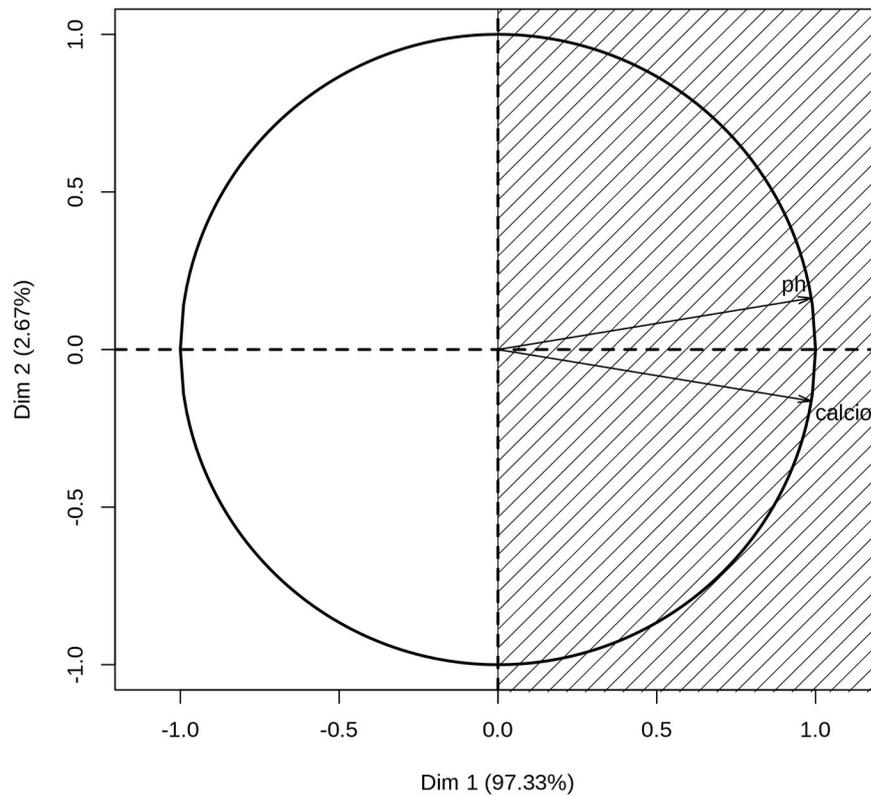


Figura 7. Análisis de las componentes principales (PCA).

La Figura 8 grafica las muestras y las elipses de confianza de 0.95 de diferentes tiempos de incubación. Cuanto mayor sea el tiempo de incubación, mayor será el pH y la concentración de Ca. Las elipses muestran la posición de las muestras con diferentes tiempos de incubación. Aunque no hay grandes diferencias, las elipses indican que cuanto mayor es el tiempo de incubación, mayor es la concentración de Ca. La Figura 9 muestra el efecto de la temperatura sobre el Ca y el pH. Los resultados indican que la temperatura no tiene efecto importante en el proceso de preparación de la BEBIDA. La Figura 10 grafica las muestras y las elipses de

confianza de 0.95 para cada cantidad de cáscara de huevo, mostrando valores de pH y concentraciones de Ca más altos a medida que aumenta la cantidad de cáscara de huevo.

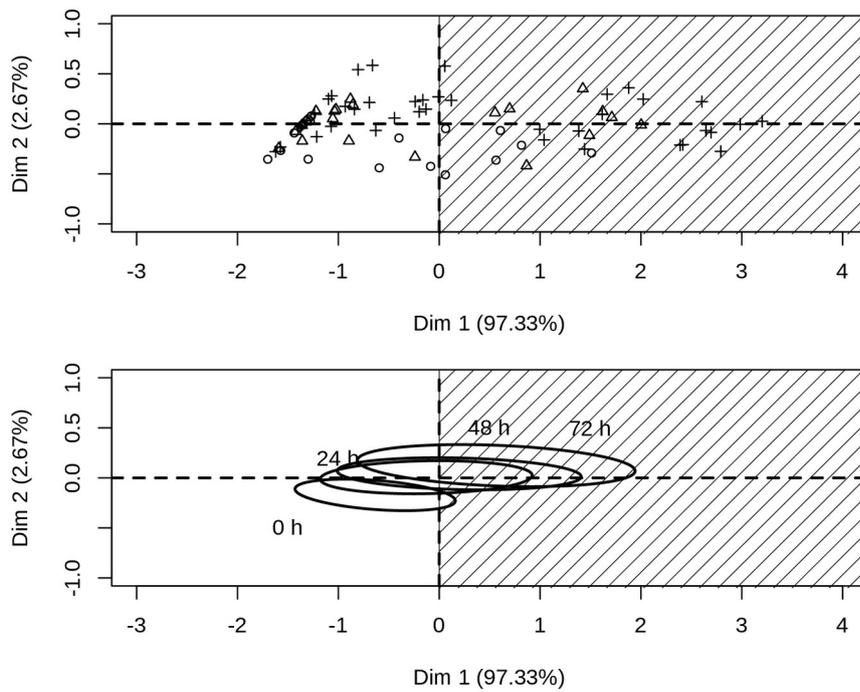


Figura 8. Panel superior, tiempo de incubación. ○: 0 h, Δ: 24 h, +: 48 h, ◇: 72 h. Panel inferior: 95 de confianza de las elipses para diferentes cantidades de cáscara de huevo. El área de la sombra derecha tiene una alta concentración de Ca y altos valores de pH.

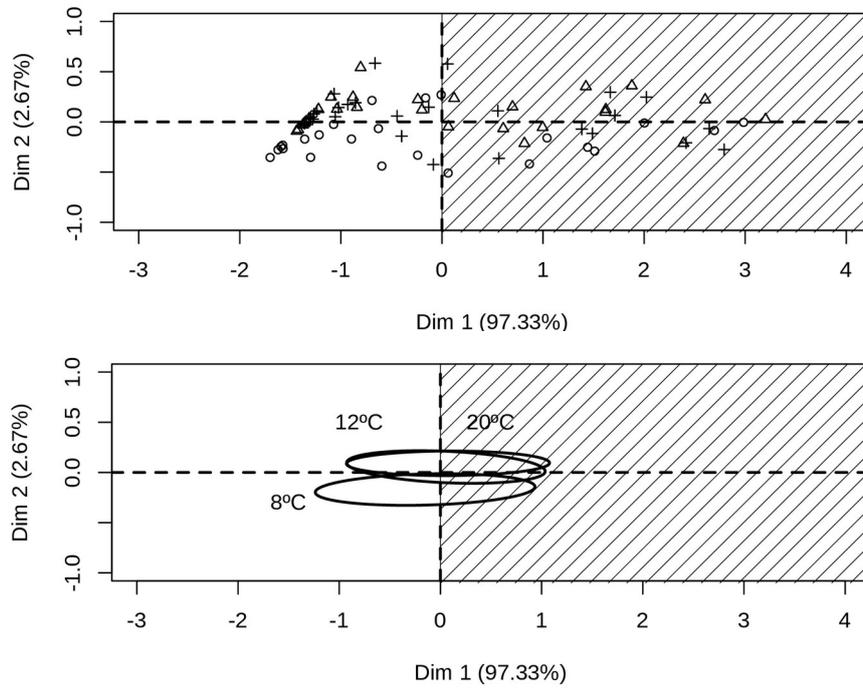


Figura 9. Panel superior, temperatura de incubación.  $\circ$ : 8 °C,  $\Delta$ : 12 °C, +: 20 °C. Panel inferior: 95 de confianza de las elipses para diferentes cantidades de cáscara de huevo. El área de la sombra derecha tiene una alta concentración de Ca y altos valores de pH.

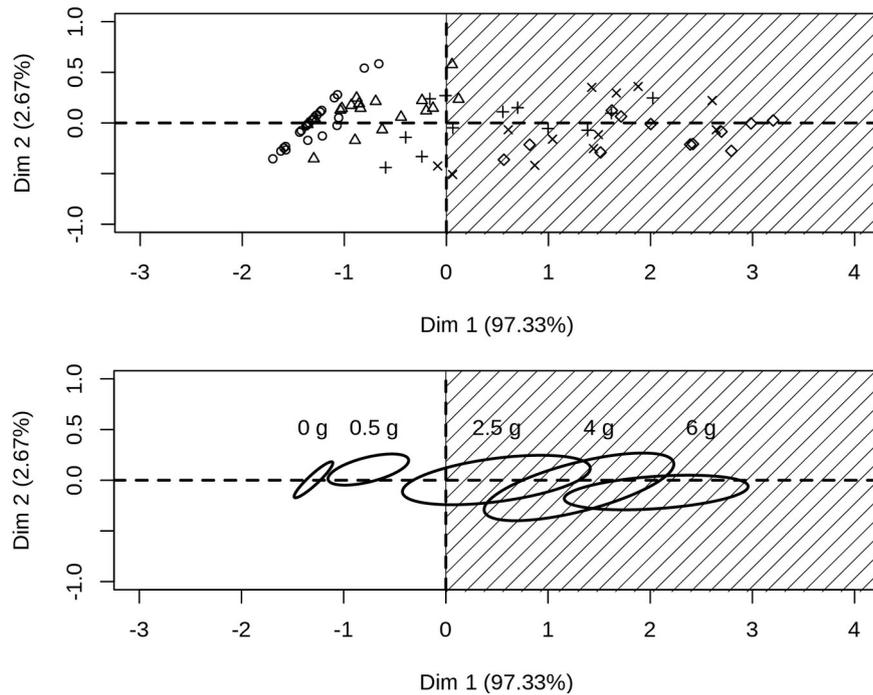


Figura 10. Panel superior, cantidad de cáscara de huevo. ○: 0 mg, Δ: 5 mg, +: 25 mg, ◇: 40 mg, x: 60 mg. Panel inferior: 95 de confianza de las elipses para diferentes cantidades de cáscara de huevo. El área de la sombra derecha tiene una alta concentración de Ca y altos valores de pH.

#### 4.1.2.2 Ensayo 2

El diseño factorial se analizó con ANOVA a 3 criterios, determinándose que los factores evaluados que influyen de manera significativa en la concentración de Ca final son: cantidad de jugo y tiempo. Se realizó un modelo lineal con un  $R^2=0.864$  y un valor de  $p<0.01$ , cuyos coeficientes se muestran en la Tabla 12. Un valor negativo o positivo del coeficiente indica que disminuye o aumenta la concentración de Ca, respectivamente.

**Tabla 12.** Coeficientes del modelo lineal propuesto para cada factor

Niveles del factor	Coeficientes (mg/L)	P-value
<i>Cantidad de jugo (mL)</i>		
200	0	
500	214.27	0.120185
1000	664.38	9.41e-05
<i>Cantidad de kéfir (g)</i>		
1	0	
2	-219.97	0.055355
<i>Tiempo (h)</i>		
0	0	
24	725.23	0.000168
48	1033.55	2.90e-06
72	1235.93	2.72e-07

*p<0.01 indica diferencia estadísticamente significativa en la concentración de Ca según los diferentes niveles de cada factor.*

En base a los coeficientes del modelo lineal se deduce que mayor cantidad de kéfir no mejora el proceso de disolución sino que lo dificulta. El experimento no permite identificar la causa de la dificultad de disolución, pero podría deberse a algún cambio en la metabolización de los carbohidratos y la generación de compuestos que puedan influir en el proceso de disolución de la cáscara de huevo. En cuanto a las cantidades de jugo, no se halló diferencia estadísticamente significativa entre 200 y 500 mL de jugo de naranja, aunque sí entre 200 y 1000 mL, aportando esta última cantidad mayor concentración de Ca. Sin embargo, con 1000 mL de jugo el sabor no resultó ser agradable. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos es generar una alternativa de Ca económica, se eligió trabajar con 200 mL de jugo de naranja.

#### 4.1.3 Formulación final de la bebida

A partir de los experimentos realizados, se desarrolló la formulación final,

denominada BEBIDA. Los ingredientes utilizados fueron:

- Kéfir: 10 g
- Cáscara de huevo: 6 g
- Jugo de naranja: 200 mL
- Agua potable: 800 mL

Procedimiento:

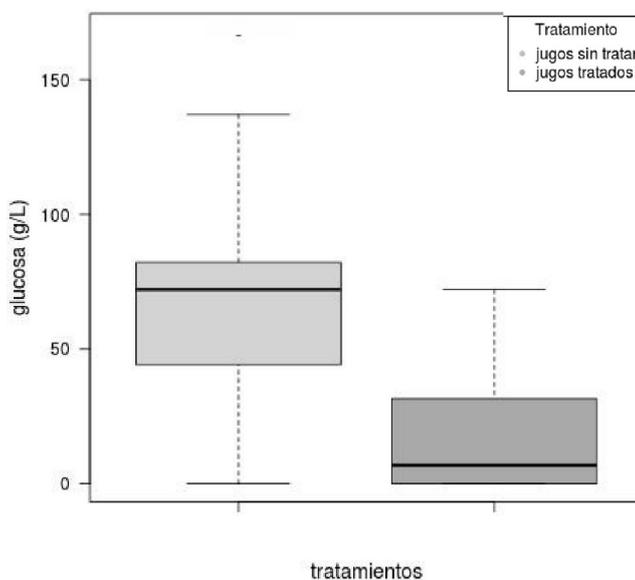
1. Se higienizaron y sanitizaron el espacio de trabajo y los materiales a utilizar.
2. Se extrajo el jugo proveniente de naranjas empleando una juguera eléctrica.
3. Se incorporaron en un erlenmeyer estéril el jugo exprimido, los gránulos de kéfir, la cáscara huevo y el agua potable a temperatura ambiente.
4. Se tapó la boca del erlenmeyer con un papel aluminio.
5. Se homogeneizó la preparación empleando vortex.
6. Se llevó a estufa de 20 °C durante 72 h para realizar la fermentación.
7. Se filtró la bebida con un embudo Buchner.
8. Los gránulos se reutilizaron para la siguiente fermentación.

La BEBIDA se mantuvo entre 4 y 8°C previo a la realización de los experimentos.

Los experimentos que se describen a continuación se llevaron a cabo con la formulación descrita anteriormente.

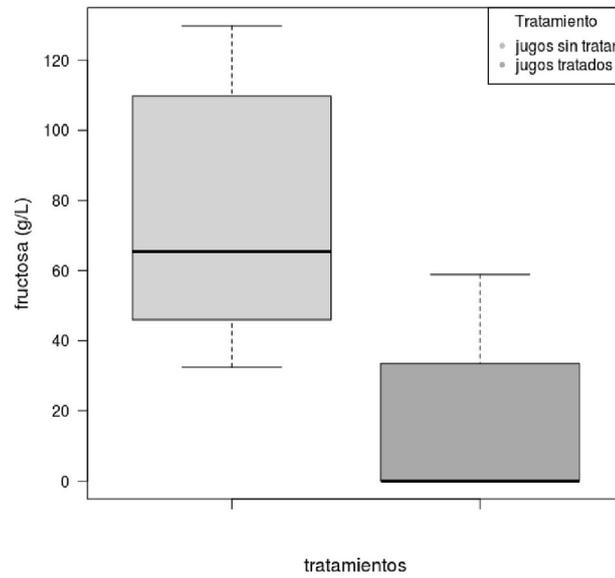
#### 4.1.3.1 Ensayo 3

Para comparar si el contenido de glucosa y fructosa en los jugos difiere antes y después del tratamiento con kéfir y cáscara de huevo, en primer lugar se analizó la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas. Para el caso de la glucosa, los datos tuvieron una distribución no normal por lo que se utilizó la prueba de Wilcoxon para datos apareados, con una  $p < 0.05$ , hallándose diferencia significativa entre ambos grupos (Figura 11).



*Figura 11. Concentración de glucosa en jugos sin tratar y jugos tratados, disminuyendo significativamente en los jugos tratados con respecto a los jugos sin tratar.*

En el caso de la fructosa, los datos tuvieron distribución normal y varianzas homogéneas, por lo que se utilizó t de Student para datos apareados, con una  $p < 0.05$ , hallando diferencia significativa entre el grupo sin tratar y tratado (Figura 12).



*Figura 12. Concentración de fructosa en jugos sin tratar y jugos tratados, disminuyendo significativamente en los jugos tratados con respecto a los jugos sin tratar.*

Por lo tanto, se observó una disminución significativa de ambos monosacáridos, evidenciándose el proceso de consumo heterotrófico por parte de los microorganismos.

## 4.2 Objetivo 2. Determinar la biodisponibilidad de calcio de la bebida estandarizada

### 4.2.1 Absorción intestinal de calcio

La absorción de Ca de la BEBIDA se evaluó a través de un modelo *ex vivo* de saco de intestino delgado evertido, comparándola con dos controles: jugo+CaCl<sub>2</sub> y agua+CaCl<sub>2</sub>.

La BEBIDA tuvo una mayor tasa de absorción que el jugo+CaCl<sub>2</sub> e, incluso, mayor que el control de agua+CaCl<sub>2</sub> (ANOVA, post test LSD,  $p < 0.05$ ). Los resultados se observan en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Tasa de absorción de Ca del saco evertido del intestino delgado *ex vivo* después de 30 min de incubación con diferentes soluciones mucosas

Soluciones mucosas	Tasa de absorción de Ca ( $\mu\text{g}/\text{min}$ )
Agua+CaCl <sub>2</sub> (n=14)	20.5 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
Jugo+CaCl <sub>2</sub> (n=14)	9.2 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>
BEBIDA (n=14)	32.8 $\pm$ 6.3 <sup>c</sup>

*Los resultados se expresan como media $\pm$ DS. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas. ANOVA a un criterio, prueba LSD ( $p < 0.05$ ).*

### 4.3 Objetivo 3. Evaluar el efecto de la bebida sobre el esmalte dental

#### 4.3.1 Análisis cuantitativo

La BEBIDA no tuvo efecto desmineralizante sobre el esmalte dental bovino. La razón de desmineralización del grupo tratado BEBIDA no difirió de los grupos saliva artificial y control bebida, aunque fue significativamente menor que la del ácido láctico (ANOVA, post-test LSD,  $p < 0.05$ ). Por su parte, la concentración de Ca liberada al final del experimento de los tratamientos BEBIDA, control bebida y saliva artificial difirió significativamente de la del ácido láctico (ANOVA, post-test LSD,  $p < 0.05$ ). Dichos resultados (media $\pm$ DS) se observan en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Razón de desmineralización (adimensional) y diferencia de Ca ( $\mu\text{g}$ )

Tratamientos	Razón de desmineralización	Diferencia de Ca
Saliva artificial	0.992 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	21 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>
Ácido láctico	0.980 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	464 $\pm$ 131 <sup>a</sup>
Control bebida	0.993 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	75 $\pm$ 23 <sup>bc</sup>
BEBIDA	0.998 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	157 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>

*Letras diferentes entre filas de la misma columna indican diferencia significativa entre soluciones. ANOVA, prueba LSD ( $p < 0.05$ ).*

### 4.3.2 Análisis cualitativo

Las imágenes MEB concuerdan con los resultados analíticos, evaluados mediante la razón del peso y la diferencia en la concentración Ca de los tratamientos (Figura 13).

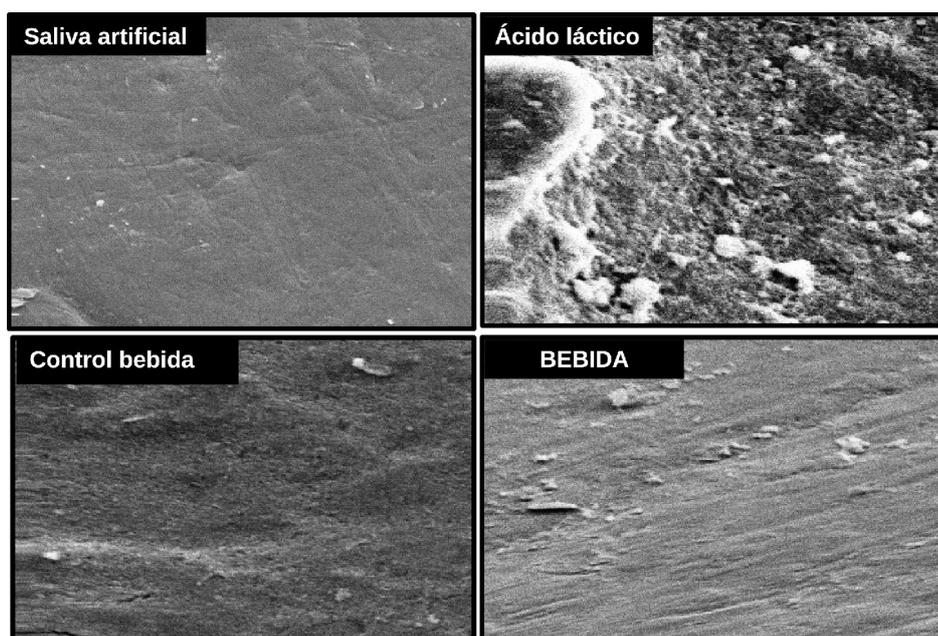


Figura 13. Superficie del esmalte dental luego de 72 h de incubación con diferentes soluciones. Las imágenes se muestran con un aumento de 3000x.

El esmalte expuesto a saliva artificial mostró una superficie sana, regular y de textura uniforme, por lo que se confirmó como control negativo de desmineralización. Por el contrario, el esmalte expuesto a ácido láctico mostró una micromorfología superficial con lesiones artificiales, correspondientes a un control positivo de desmineralización. Por su parte, en el control bebida no se observaron áreas desmineralizadas y la BEBIDA mostró una superficie de esmalte saludable, regular y con una textura uniforme, similar a lo observado para saliva artificial y control bebida.

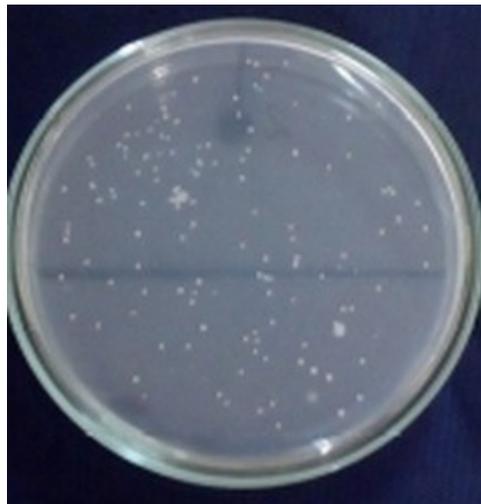
Los resultados obtenidos demostraron el efecto no desmineralizante de la BEBIDA sobre el esmalte dental bovino, aún con un pH ácido, incluso teniendo una razón de desmineralización mayor que la saliva artificial, comprobado tanto analíticamente como cualitativamente.

#### 4.4 Objetivo 4. Evaluar la calidad microbiológica de la bebida

##### 4.4.1 Ensayos microbiológicos

##### 4.4.1.1 Método de screening: búsqueda de microorganismos

Se observó desarrollo microbiano en las placas sembradas con APC (Figura 14). Se observaron colonias pequeñas y colonias más grandes, luego de estar 72 h en estufa a 28 °C. Presuntivamente, inferimos- de acuerdo al tamaño de las colonias observadas- dos clases de microorganismos.



*Figura 14. Desarrollo microbiano en medio APC.*

Las colonias crecidas en APC fueron observadas al microscopio óptico con azul de lactofenol, pudiendo observarse estructuras levaduriformes- correspondientes a las colonias más grandes- y estructuras bacilares- correspondientes a las colonias más pequeñas, como se observa en la Figura 15.

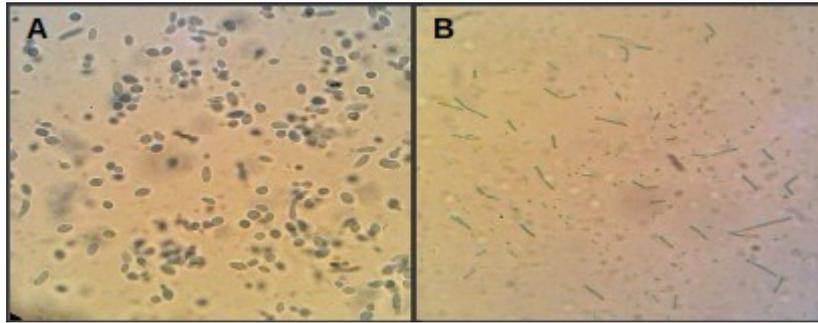


Figura 15. Observación microscópica. Examen directo con azul de lactofenol a 400x de las colonias crecidas en APC. A: estructuras levaduriformes. B: estructuras bacilares.

A partir de estos resultados, se derivaron estudios micológicos y bacteriológicos.

#### 4.4.2 Ensayos micológicos

##### 4.4.2.1 Recuento de hongos filamentosos y levaduriformes

Se realizó el recuento de las colonias fúngicas obtenidas, siendo colonias de levaduras el componente fúngico encontrado. El recuento fue  $2.93 \cdot 10^7$  UFC/mL correspondientes a la BEBIDA y  $8.00 \cdot 10^7$  UFC/g correspondientes a los gránulos de kéfir (Figura 16).

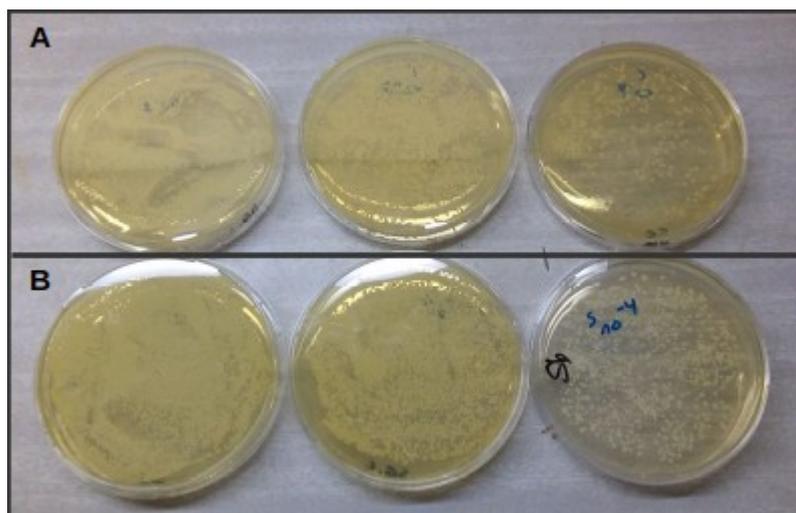


Figura 16. Desarrollo de levaduras en medio SG de diluciones sucesivas. A: BEBIDA. B: gránulos de kéfir.

Las colonias crecidas en el medio SG, teñidas con azul de lactofenol y observadas al microscopio óptico con azul de lactofenol con un aumento de 400x. Se evidenciaron como estructuras levaduriformes (Figura 17).

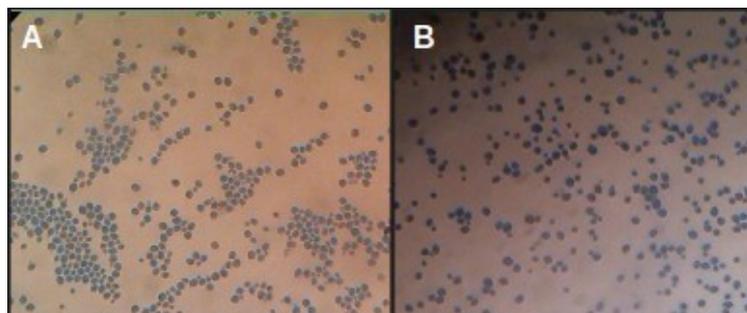


Figura 17. Colonias crecidas en medio SG observadas al microscopio óptico. A: BEBIDA. B: gránulos de kéfir.

Además, se realizó la tinción de Gram-Nicolle, observándose estructuras levaduriformes (Figura 18).



Figura 18. Observación microscópica, tinción Gram-Nicolle vista a 100x.

#### 4.4.2.2 Identificación presuntiva de levaduras

De las levaduras crecidas en medio CHROMagar™-Candida, se observó un mismo color y morfología de colonias, tanto de la BEBIDA como de los gránulos de kéfir (Figura 19). El color obtenido (violáceo) no fue concluyente para ninguna de las especies que presuntivamente se pueden inferir con esta metodología.

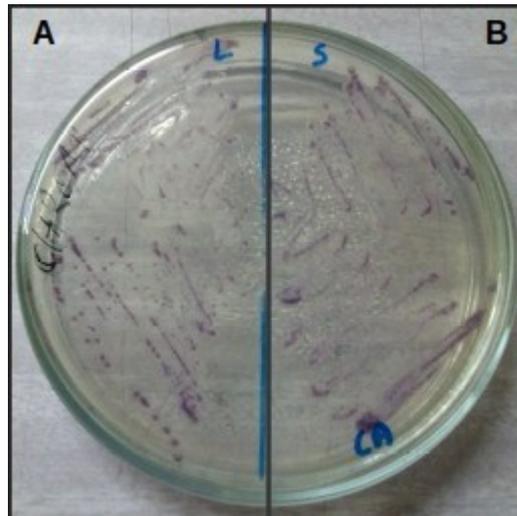


Figura 19. Colonias levaduriformes crecidas en CHROMagar™-Candida. A: BEBIDA. B: gránulos de kéfir.

#### 4.4.2.3 Búsqueda de clamidoconidias

A partir de las colonias levaduriformes aisladas en las placas con medio agar SG se realizó un repique en medio en AL, observándose ausencia de clamidoconidias (Figura 20).

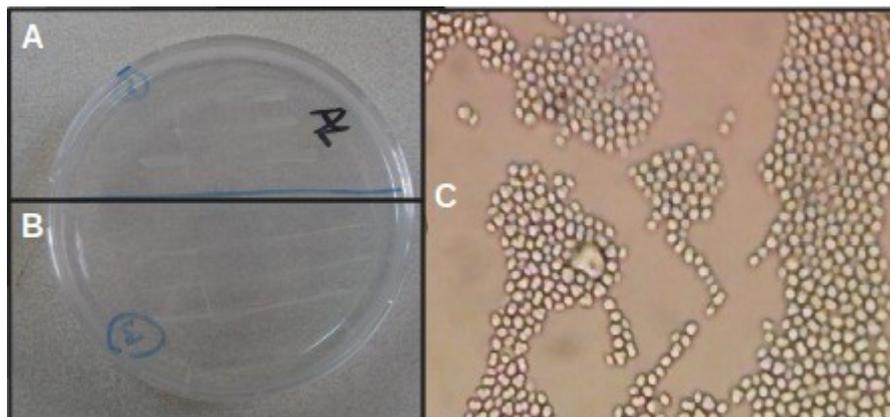


Figura 20. A: siembra en AL de las levaduras de la BEBIDA. B: siembra en AL de las levaduras obtenidas desde los gránulos de kéfir. C: observación microscópica.

#### 4.4.2.4 Identificación definitiva de levaduras

Las levaduras crecidas en el medio CHROMagar™-*Candida* se repicaron en el medio SG para obtener colonias frescas. Luego se realizó la prueba bioquímica ID 32C, identificándose *Saccharomyces cerevisiae* con un porcentaje de identificación del 99% (Figura 21).

<b>Galería</b>	ID 32 C V3.0		
<b>Perfil</b>	5 0 6 4 0 4 2 0 0 1		
<b>Nota</b>			
<b>Taxón significativo</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.0	0.61	MEL5%

Figura 21. Resultados del equipo ID 32C.

#### 4.4.3 Ensayo bacteriológico

##### 4.4.3.1 Recuento de mesófilos aerobios viables

El recuento de mesófilos aerobios viables fue  $3.1 \cdot 10^7$  UFC/mL correspondientes a la BEBIDA y  $4.0 \cdot 10^9$  UFC/g correspondientes a los gránulos de kéfir (Figura 22).

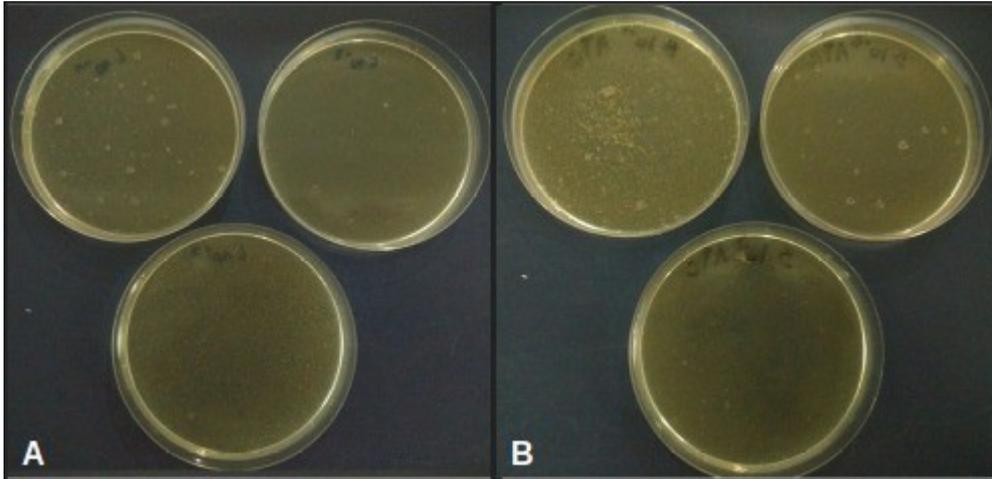


Figura 22: colonias crecidas en APC de las diluciones  $1/10^1$ ,  $1/10^2$  y  $1/10^3$ . A: BEBIDA. B: gránulos de kéfir.

#### 4.4.3.2 Recuento de bacterias coliformes totales

Se observó ausencia de coliformes totales en las placas de AVRB-L sembradas con las distintas diluciones de la BEBIDA y de los gránulos de kéfir (Figura 23).

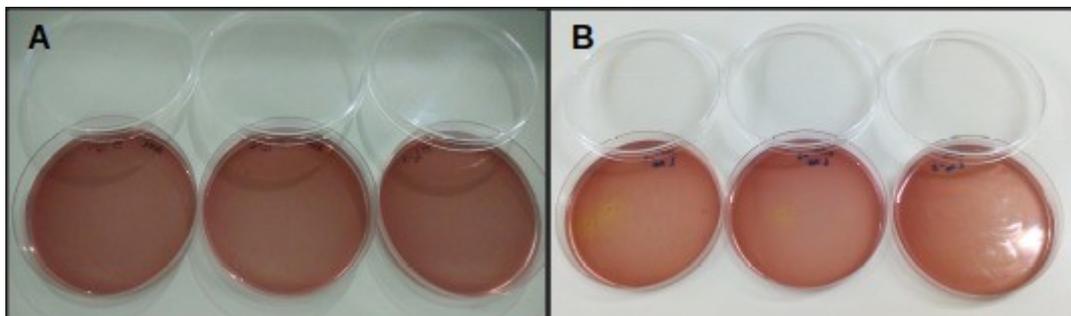


Figura 23. Placas con medio AVRB-L de diluciones  $1/10^1$ ,  $1/10^2$  y  $1/10^3$ . A: BEBIDA. B: gránulos de kéfir.

#### 4.4.3.3 Determinación de coliformes fecales

Se observó ausencia de coliformes fecales en las placas de agar LEVINE sembradas con las diferentes diluciones de la BEBIDA y de los gránulos de kéfir (Figura 24).

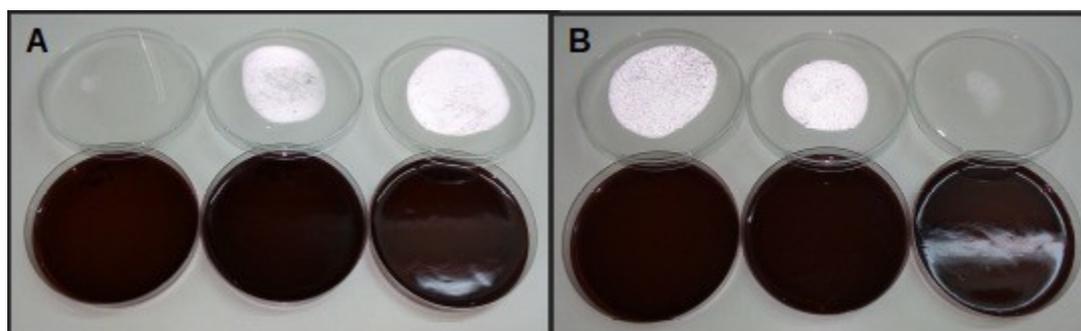


Figura 24. Placas con medio agar LEVINE de diluciones  $1/10^1$ ,  $1/10^2$  y  $1/10^3$ . A: BEBIDA. B: gránulos de kéfir.

#### 4.4.3.4 Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

No se observó crecimiento de colonias en las placas de agar BP sembradas con las distintas diluciones de la BEBIDA (Figura 25).

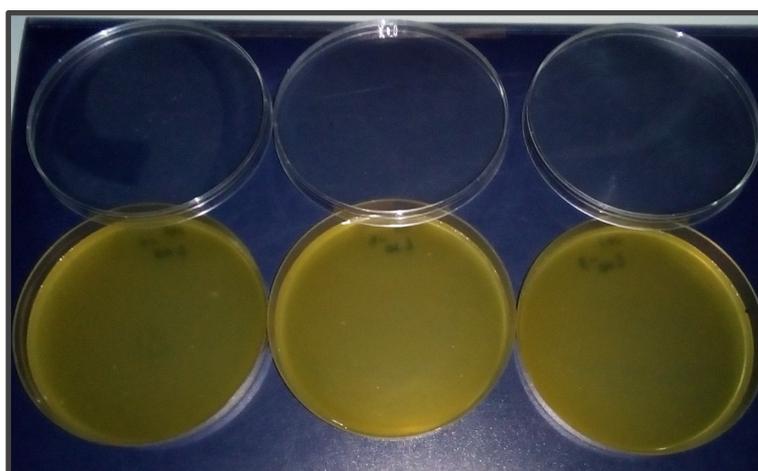


Figura 25. Placas con medio agar BP sembradas con diluciones  $1/10^1$ ,  $1/10^2$  y  $1/10^3$  de la BEBIDA.

Al analizar las placas sembradas con las diluciones provenientes de los gránulos de kéfir, se observó crecimiento de colonias típicas de *Staphylococcus aureus* en la dilución  $1/10^1$  (Figura 26).

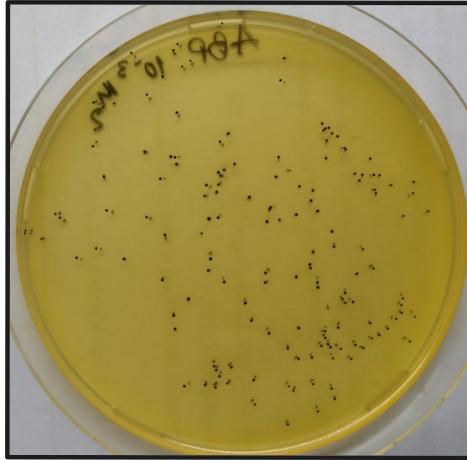


Figura 26. Colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* en la placa de dilución  $1/10^1$  de los gránulos de kéfir.

#### 4.4.3.4.1 Confirmación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Se realizó la tinción de Gram-Nicolle, observándose cocos Gram positivos (Figura 27).

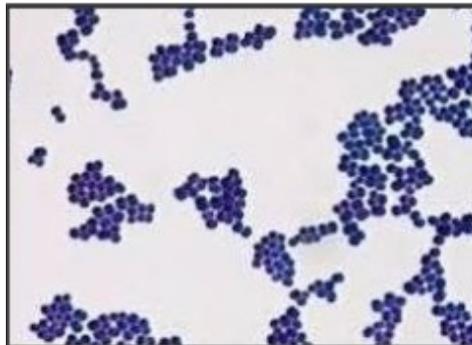


Figura 27. Observación al microscopio óptico con 100x.

Se realizó la prueba bioquímica de la catalasa, en la cual se observó presencia de burbujeo, resultando ser positiva (Figura 28).

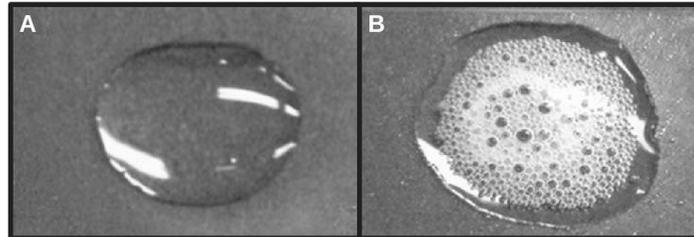


Figura 28. Prueba de la catalasa. A: control negativo. B: colonia en estudio.

Finalmente, se realizó la prueba de la DNasa, en la que se observó ausencia de una zona de aclaramiento alrededor de la estría de desarrollo de la colonia bacteriana en estudio (Figura 29).

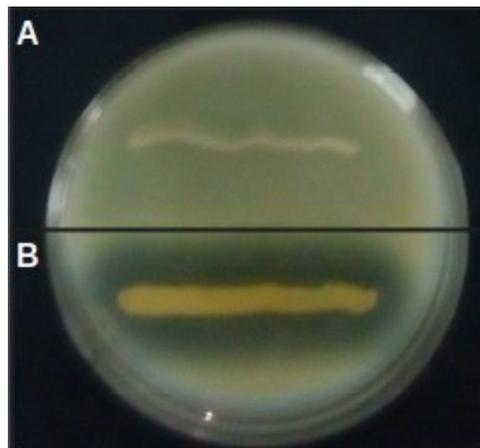


Figura 29. Prueba de la DNasa. A: control positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC25923); B: colonia en estudio.

A partir de las colonias desarrolladas en el agar BP, se realizó un reaisle en ASC para observar la presencia o ausencia de hemólisis. Las colonias desarrolladas no evidenciaron tener actividad hemolítica (Figura 30).

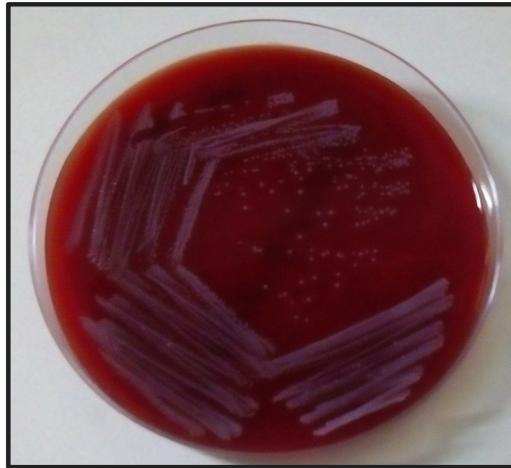


Figura 30. Reaisle de colonias crecidas en BP de gránulos de kéfir en medio ASC.

Las pruebas bioquímicas realizadas confirmaron ausencia de *Staphylococcus aureus* en la muestra analizada.

#### 4.4.3.5 Búsqueda de *Salmonella*

Se observó ausencia de *Salmonella* en las placas sembradas con los caldos RV y TT de la BEBIDA y los gránulos de kéfir, en los tres medios diferenciales y selectivos empleados (Figura 31).

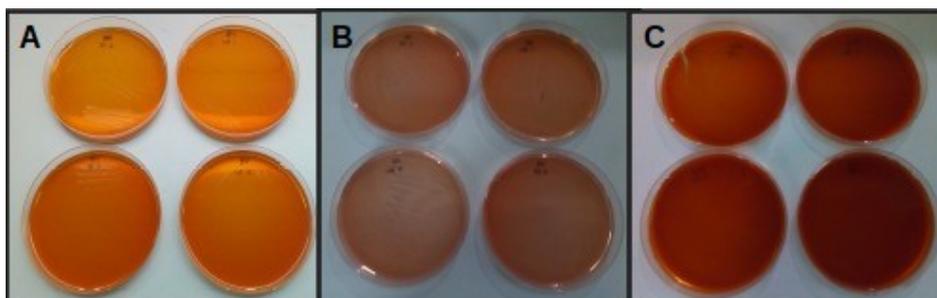


Figura 31. A: medio VB. B: medio SS. C: medio KLD.

#### 4.4.3.6 Recuento de BAL

Las colonias crecidas en MRS presentaron característica cremosa y color

blancuzco (Figura 32). Se cuantificó  $1.54 \cdot 10^7$  UFC/mL correspondiente a la BEBIDA y  $4.68 \cdot 10^9$  UFC/g correspondiente a los gránulos de kéfir.



*Figura 32. Desarrollo de bacterias en medio MRS.*

A partir de las colonias crecidas en MRS se realizó la tinción Gram-Nicolle, observándose bacilos Gram positivos. (Figura 33).



*Figura 33. Observación microscópica, tinción Gram-Nicolle vista a 100x.*

#### *4.4.3.6.1 Determinación fenotípica de actividad hemolítica*

Las colonias crecidas en MRS se reislaron en ASC, evidenciándose alfa hemólisis (Figura 34).

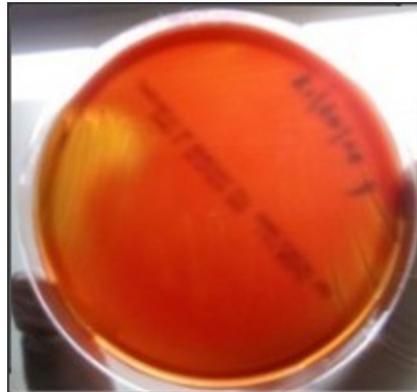


Figura 34. Reaisle de colonias crecidas en MRS en medio ASC.

Luego se realizaron las pruebas bioquímicas catalasa y citocromo-oxidasa (Figura 35). La prueba catalasa fue negativa debido a la ausencia de burbujeo al poner en contacto la colonia en estudio con el  $H_2O_2$ . La prueba de la citocromo-oxidasa fue negativa porque la muestra resultó ser incolora.

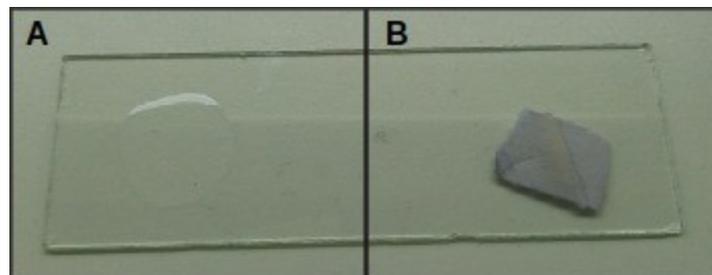


Figura 35. A: prueba catalasa. B: prueba citocromo-oxidasa.

#### 4.4.3.6.2 Identificación de BAL

Las colonias crecidas en el ASC fueron identificadas a través de espectrometría de masa utilizando MALDI-TOF como *Lactobacillus paracasei* (score 2.6).

Adicionalmente, se observó presencia de crecimiento microbiano en las placas con MRS sembradas con el jugo de naranja, los gránulos de kéfir y sus respectivas

diluciones sin tratamiento térmico y con los tratamientos 1 y 2. En aquellas placas sembradas con el jugo de naranja sin tratamiento térmico y sus respectivas diluciones, y con el jugo sometido a los tratamientos 1 y 2, no se observó desarrollo bacteriano. Al analizar las placas sembradas con los gránulos de kéfir, se observó crecimiento microbiano en los gránulos sin tratamiento térmico y en los sometidos a los tratamientos 1 y 2.

#### 4.4.3.6.3 Caracterización e identificación de aislamientos

A partir de los aislamientos desarrollados en MRS de los gránulos de kéfir sin tratamiento térmico, se seleccionaron tres colonias con características macroscópicas diferentes y se reislaron en medio ASC. A cada una de ellas, se les realizó la coloración de Gram-Nicolle, determinación fenotípica de hemólisis, pruebas catalasa y citocromo-oxidasa y la identificación bioquímica empleando el método API 50 CHL. Los resultados obtenidos para los tres aislamientos analizados fueron coincidentes. A la coloración de Gram-Nicolle se observaron bacilos Gram positivos y las pruebas de la catalasa y citocromo-oxidasa resultaron negativas. El perfil de pruebas bioquímicas miniaturizadas permitieron identificar a cada uno de los aislamientos como *Lactobacillus paracasei*.

#### 4.5 Objetivo 5. Evaluar la aceptabilidad de consumo de la bebida en seres humanos

Se evaluó la aceptabilidad de la BEBIDA a través de una prueba sensorial (orientada al consumidor) que incluyó una prueba hedónica más una escala JAR.

En esta prueba participaron 48 individuos, de los cuales un 14.6% respondió me gusta mucho, un 43.6% me gusta, un 35.4% le resultó indiferente y un 6.3% no le gustó. La media de aceptabilidad fue de 3.7 y un 75% respondió que sí lo consumiría.

En cuanto a los atributos sensoriales, se destaca que un 83.3% sintió “poco” sabor naranja y ningún participante marcó la opción “mucho” (Figura 36).

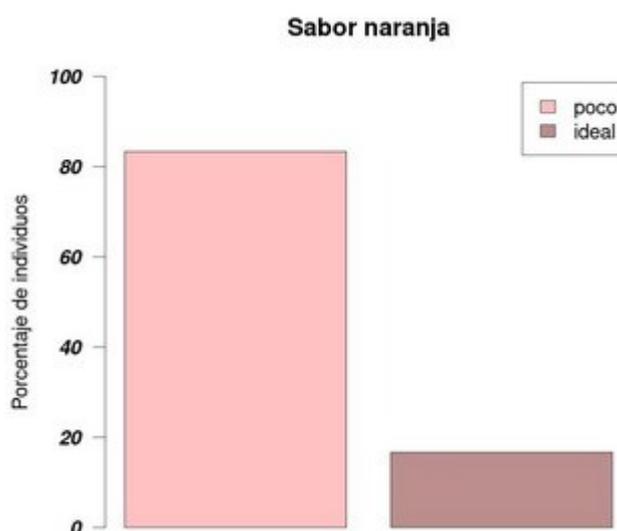


Figura 36. Porcentaje de individuos según el atributo sensorial sabor naranja.

Un 70.8% sintió “ideal” la acidez mientras que un 18.8% sintió “poco” y un 10,4% “mucho” (Figura 37).

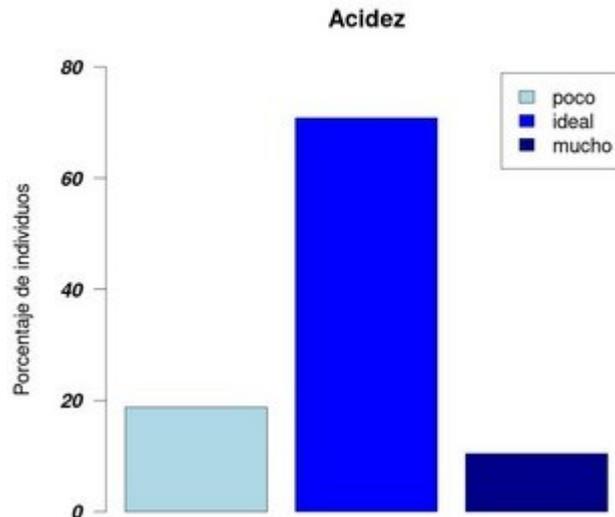


Figura 37. Porcentaje de individuos según el atributo sensorial acidez.

Y en cuanto a la dulzura, un 58.3% marcó la opción “poco”, un 39.6% “ideal” y solo un 2.7% marcó “mucho” (Figura 38).

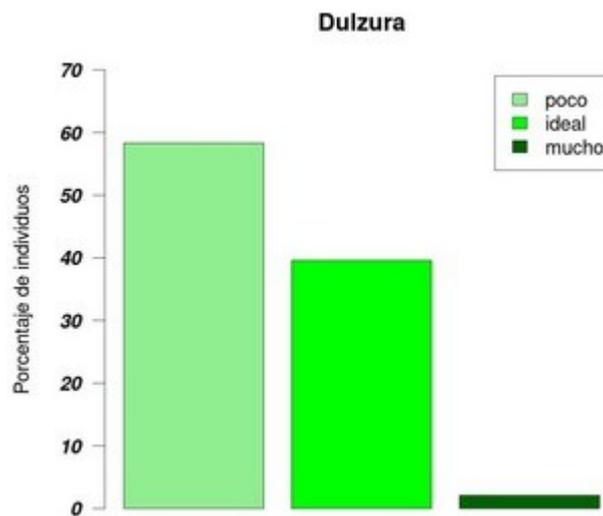


Figura 38. Porcentaje de individuos según el atributo sensorial dulzura.

### Análisis de penalización

Los atributos sensoriales fueron analizados según el grado de satisfacción a través de un análisis de penalización. Con este método se puede ver si el hecho de que un atributo situado por debajo del punto “ideal” o por encima, ha “penalizado” en la

puntuación de aceptación global de la BEBIDA. Para ello, primero se calculó la media de aceptabilidad para cada atributo en sus 3 niveles (poco, ideal, mucho), los cuales se pueden observar en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Media de aceptabilidad para cada atributo según niveles

<b>Niveles</b>	<b>Acidez</b>	<b>Sabor naranja</b>	<b>Dulzura</b>
Poco	3.55	3.55	3.5
Ideal	3.82	4.25	3.89
Mucho	2.8	0	4

Con los datos anteriores se calculó el valor de penalización para los niveles “poco” y “mucho” de cada atributo, como se observa en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Porcentaje de individuos y valor de penalización

<b>Atributo</b>	<b>Nivel</b>	<b>% individuos</b>	<b>Penalización</b>
Dulzura	poco	58.3	0.39
	mucho	39.6	-0.11
Acidez	poco	18.8	0.27
	mucho	10.4	1.02
Sabor naranja	poco	83.3	0.7
	mucho	0	

A partir de dicho análisis, se puede considerar que el parámetro que mayor efecto ha tenido en la penalización de la aceptación global ha sido el “poco” sabor a naranja del producto, ya que presenta un alto valor de penalización (cercano a 1) y un alto % de individuos (>80%). La percepción de mucha acidez es un parámetro que influye en la aceptación global de la BEBIDA pero en menor medida, ya que si bien presenta un valor de penalización mayor a 1, el porcentaje de individuos es bajo (10.4%). El resto de los parámetros han obtenido valores de penalización bajos (<1) y

porcentaje de individuos bajos (<80%). Por lo tanto, se podría concluir que nos deberíamos centrar en la mejora de la acidez y el sabor naranja para aumentar la aceptación de la BEBIDA.

#### 4.6 Objetivo 6. Evaluar y describir el perfil de los consumidores de kéfir

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la encuesta realizada (autoadministrada a través de una plataforma digital) con el objetivo de describir el perfil de los consumidores de kéfir, ya que este es uno de los ingredientes determinantes del sabor de la BEBIDA. La muestra estuvo constituida por un n de 285 individuos.

##### 4.6.1 Análisis descriptivo

##### 4.6.1.1 Análisis descriptivo sociodemográfico

La Tabla 17 muestra un análisis descriptivo y estadístico de los datos sociodemográficos de la muestra estudiada.

**Tabla 17.** Descripción sociodemográfica de la muestra estudiada

Variable	Subniveles			Test proporciones
Sexo	Mujeres <sup>a</sup> 82.8% (n=236)	Hombres <sup>b</sup> 17.19% (n=49)		p<0.05
Ocupación	Estudiantes <sup>a</sup> 46.7% (n=133)	Trabajadores de salud <sup>b</sup> 23.5% (n=67)	Otros <sup>b</sup> 29.8% (n=85)	p<0.05
Ingresos mensuales	Altos <sup>a</sup> 22.4% (n=64)	Medios <sup>b</sup> 67.7% (n=193)	Bajos <sup>c</sup> 8.5% (n=24)	p<0.05
Edad	Rango= 16-78 años, mediana= 27 años			

*n* representa el número de individuos y los porcentajes se calcularon en función del número total de encuestados, 285. Para la variable ingresos mensuales el total de los individuos fue 281. Superíndice diferente entre filas en dos subniveles de la misma fila indica diferencia significativa entre ellos.

#### 4.6.2 Análisis descriptivo del tipo de consumidores

En la Tabla 18 se muestra un análisis descriptivo de las variables específicas para analizar el tipo de consumidores de la muestra estudiada.

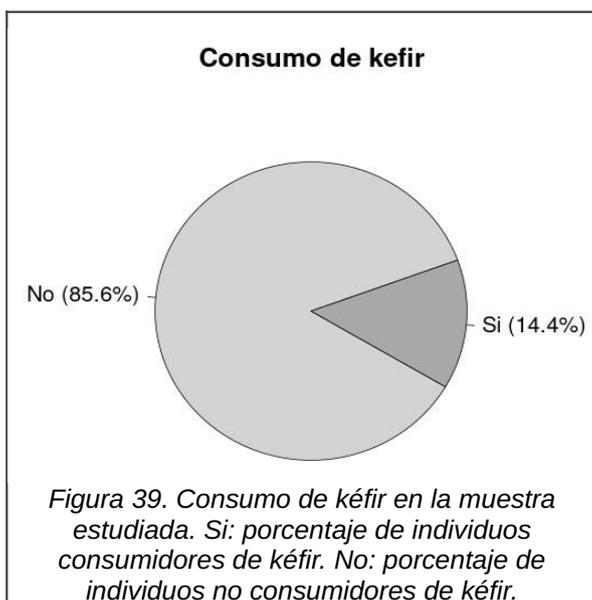
**Tabla 18.** Descripción del tipo de consumidores de la muestra en estudio

Variable	Subniveles			Test proporciones	
Tipo alimentación	Omnívora <sup>a</sup> 84.2% (n=240)	Vegetariana <sup>b</sup> 15.8% (n=45)		p<0.05	
Lugar de compra	Supermercado <sup>a</sup> 45.2% (n=129)	Lugares específicos <sup>a</sup> 44.9% (n=128)	Dietética <sup>b</sup> 4.9% (n=14)	Almacén <sup>b</sup> 4.9% (n=14)	p<0.05
Procedencia comida	Casero <sup>a</sup> 85.6% (n=244)	Alimentos pre-elaborados <sup>b</sup> 11.22% (n=32)	Delivery <sup>c</sup> 1.75% (n=5)	Viandas <sup>c</sup> 1.4% (n=4)	p<0.05
Horas diarias alimentación	Rango= 1-7 horas, mediana= 4 horas				

*n* representa el número de individuos y los porcentajes se calcularon en función del número total de encuestados, 285. Superíndice diferente entre filas en dos subniveles de la misma fila indica diferencia significativa entre ellos.

#### 4.6.3 Análisis descriptivo de los individuos consumidores de kéfir

El 14.4% de los individuos (n=41) resultaron ser consumidores de kéfir (Figura 39). El porcentaje de individuos consumidores de kéfir es significativamente menor que la cantidad de individuos no consumidores de kéfir (test de proporciones, p<0.05).



En la Tabla 19 se muestra un análisis descriptivo de los consumidores de kéfir, teniendo en cuenta las distintas variables estudiadas.

Tabla 19. Descripción de los consumidores de kéfir

Variable	Subniveles				Test proporciones
Como conoció	Amistades <sup>a</sup> 46.3 % (n=19)	Profesional de la salud <sup>a</sup> 24.3% (n=10)	Redes sociales <sup>a</sup> 26.8% (n=11)	Vendedor <sup>b</sup> 2.4% (n=1)	p<0.05
Motivo de consumo	Bienestar y salud <sup>a</sup> 70.7% (n=29)	Gusto <sup>b</sup> 17.1% (n=7)	Recomendación no médica <sup>b</sup> 12.2% (n=5)		p<0.05
Tipo de kéfir	Agua+azúcar+fruta <sup>a</sup> 73.2% (n=30)	Agua+azúcar <sup>b</sup> 9.75% (n=4)	Leche <sup>b</sup> 9.75% (n=4)	Ambos <sup>b</sup> 7.3% (n=3)	p<0.05
Frecuencia de consumo	Diaria 41.5% (n=17)	Semanal 39% (n=16)	Mensual 19.5% (n=8)		p>0.05
Edad	Rango= 19-65 años, mediana= 29 años				

*n* representa el número de individuos de cada subnivel y los porcentajes se calcularon en función del número total de los individuos consumidores de kéfir (*n*=41). Superíndice diferente entre dos subniveles de la misma fila indica diferencia significativa.

#### 4.6.4 Análisis descriptivo de los individuos no consumidores de kéfir

Se interrogó acerca de las causas de porqué los individuos no consumen kéfir.

En la Tabla 20 se enuncian las principales causas de los no consumidores de kéfir.

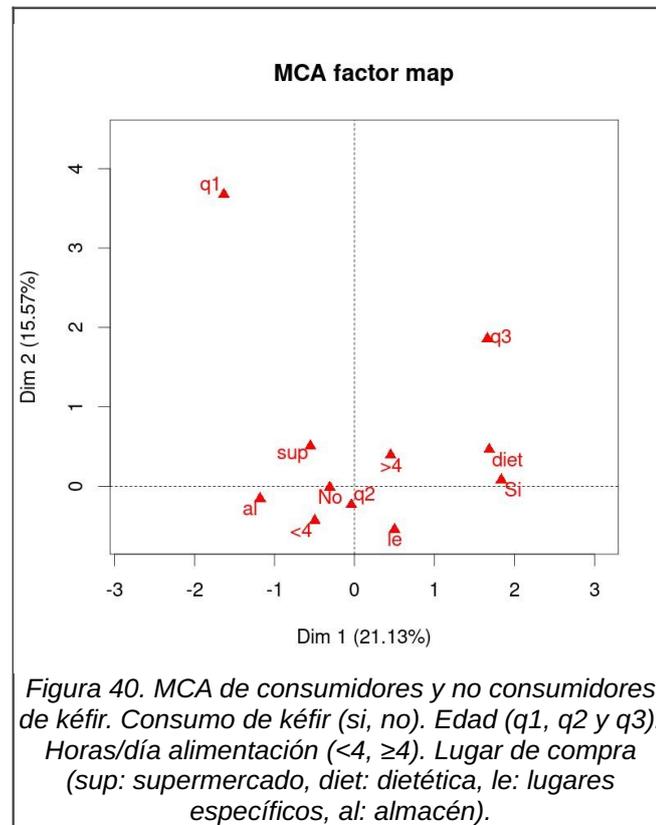
**Tabla 20.** Descripción de las causas de los individuos no consumidores de kéfir

Causas del no consumo de kéfir					
Desconocimiento <sup>a</sup>	Requiere mucho tiempo <sup>b</sup>	Desinterés <sup>b</sup>	No probaron/ No consiguieron <sup>b</sup>	No le gusta <sup>bc</sup>	Otras <sup>c</sup>
64.1% (n=156)	12.7% (n=31)	9% (n=22)	8.2% (n=20)	4.5% (n=11)	1.2% (n=4)

*n* representa el número de individuos de cada subnivel y los porcentajes se calcularon en función del número total de los individuos no consumidores de kéfir ( $n=244$ ). Test de proporciones ( $p<0.05$ ), superíndice diferentes indican diferencia significativa.

#### 4.7 Análisis cualitativo

Se realizó un análisis cualitativo para identificar asociaciones entre las variables estudiadas. Para ello se realizó el análisis de las correspondencias múltiples (MCA), para lo cual la variable edad se categorizó ( $q_1 \leq 18$  años,  $q_2 = 19-59$  años,  $q_3 \geq 60$  años), es decir, en adolescentes, adultos y adultos mayores. De la misma manera se procedió con las horas diarias dedicadas a la preparación y consumo de alimentos ( $<4$  h diarias,  $\geq 4$  h diarias), tomando como referencia 1 h/comida del día. Se encontró asociación entre los consumidores de kéfir y las siguientes variables: edad mayor a 18 años, más de 4 h diarias dedicadas a la preparación y consumo de alimentos y, realizar las compras en la dietética (Figura 40).



En la zona derecha del gráfico se muestra una agrupación de los individuos consumidores de kéfir. Se puede comprobar que en esa zona se encuentran el nivel “q3” de edad, el nivel “diet” como lugar de compra,  $\geq 4$  h diarias dedicadas a la preparación y consumo de alimentos y el nivel “Sí”, referido al consumo de kéfir. Además, se puede observar que existe una fuerte asociación entre “Sí” y “diet” como entre “No”, “sup” y “<4 h”. Se observa con claridad que los consumidores de kéfir son predominantemente mayores de 18 años.

Para profundizar en el estudio, se realizó un análisis de *clusters* para identificar subgrupos con características semejantes. Se identificaron 12 *clusters*, 3 de ellos corresponden específicamente a los consumidores de kéfir:

- *Cluster* 10: consumidores de kéfir, lugares específicos, q2 de edad y  $\geq 4$  h diarias destinadas a la alimentación.

- *Cluster 11*: consumidores de kéfir, dietética, q2 de edad y  $\geq 4$  h diarias destinadas a la alimentación.
- *Cluster 12*: consumidores de kéfir, lugares específicos, q3 de edad y  $\geq 4$  h diarias destinadas a la alimentación.

En contraposición con los *clusters* 10, 11 y 12, el *cluster* 1 tuvo las siguientes características: no consumidores de kéfir, supermercado, q1 de edad y  $< 4$  h diarias destinadas a la alimentación.

### 4.8 Análisis cuantitativo

A partir del análisis MCA descrito anteriormente, se realizó un análisis de asociación utilizando Chi cuadrado, a través del cual se halló asociación estadísticamente significativa entre el consumo de kéfir y las siguientes variables: edad, horas diarias dedicadas a la preparación y consumo de alimentos, y lugar de compra.

## 5 Discusión

El Ca es un componente esencial y crítico para la salud humana, sin embargo, la gran mayoría de las personas no cubre la IDR, especialmente las poblaciones de países subdesarrollados [20].

Históricamente, los productos lácteos han sido la fuente más importante de Ca en la dieta debido a que combinan un alto contenido de este componente con una alta biodisponibilidad. Sin embargo, por diversas causas relacionadas a enfermedades, costos, hábitos alimenticios, gustos o estilos de vida no siempre son consumidos (9).

La intolerancia a la lactosa afecta a un gran porcentaje de la población y puede predisponer a una salud ósea subóptima, osteoporosis y fracturas por fragilidad cuando se acompaña de una disminución de la ingesta de lácteos. Los tratamientos son costosos y la suplementación con comprimidos a veces implica dificultades de adherencia al tratamiento (81). El reemplazo de la leche de vaca por bebidas vegetales requiere aún más investigación para comprobar los efectos de su consumo a largo plazo sobre la salud ósea [9].

Otras fuentes de Ca estudiadas en numerosos trabajos muestran la importancia de este ión. Brun et al (2013) han evaluado la composición química de la cáscara de huevo, hallando que es una fuente de Ca apropiada y económica para la nutrición humana. Además, el polvo de cáscara de huevo disuelto en vinagre, jugo de limón y naranja podría ser útil [67].

El desarrollo de nuevas fuentes de Ca, no derivadas de matrices alimentarias lácteas, son importantes para cubrir las necesidades diarias de Ca. El objetivo de la presente tesis fue desarrollar una bebida no láctea fuente de Ca a base de kéfir, cáscara de huevo y jugo de frutas. Para ello, se realizó la optimización de la

preparación, denominando la formulación final como BEBIDA. Luego, se profundizó la caracterización de la mencionada formulación mediante la evaluación de la composición microbiológica, la absorción intestinal y el efecto sobre el esmalte dental. Además se evaluó el aspecto sensorial y se realizó un estudio sobre los consumidores de kéfir.

Si bien se ha evaluado el jugo proveniente de pomelo, mandarina, limón y naranja, se seleccionó este último debido al mayor contenido de hidratos de carbono y por ser la principal fruta cítrica que se produce a nivel mundial. El contenido de Ca en promedio de la BEBIDA es de 180 mg Ca/porción, cubriendo el 18% de la IDR y, por lo tanto, podría considerarse como alimento fuente de Ca según la regulación del CAA. En el mercado no se encuentran disponibles jugos comerciales fortificados con Ca y las bebidas vegetales caseras no aportan importante cantidad de Ca. Un estudio evaluó el contenido de nutrientes de bebida artesanal a base de almendra y halló que el contenido de Ca en la porción varió entre 20-36 mg, cubriendo sólo el 2% de la IDR [111]. Por su parte, la mayoría de las bebidas vegetales comerciales están fortificadas con Ca (carbonato de Ca), aunque no hay evidencia científica sobre su biodisponibilidad, y debido a diferencias en composición química, éstas no pueden considerarse sustitutos nutricionales de la leche de vaca [112,114].

La absorción intestinal de Ca de la BEBIDA fue mayor que el agua+CaCl<sub>2</sub>. Se ha reportado que las aguas minerales ricas en Ca son una fuente valiosa y biodisponible de Ca con efectos beneficiosos medidos a través de biomarcadores y parámetros densitométricos óseos en seres humanos [115]. Además, la absorción intestinal de Ca de la BEBIDA fue significativamente mayor que la del jugo+CaCl<sub>2</sub>. Esta diferencia podría explicarse por la presencia de citrato y otras sustancias presentes en el jugo, que tiene una acción compleja con el Ca. El kéfir podría metabolizar estos ácidos,

evitando la formación de Ca de baja absorción. Un estudio *in situ* evaluó la absorción de Ca de kéfir de leche en comparación con la leche de vaca, no hallando diferencia significativa [82]. El estudio de la absorción de Ca a través de un modelo *ex vivo* utilizando sacos duodenales evertidos, contribuye a un mejor control de los experimentos aunque con el modelo utilizado no es posible evaluar la absorción de Ca teniendo en cuenta la integridad total del sistema.

Un estudio realizado *in vitro* sobre piezas dentarias humanas halló menor pérdida de Ca del esmalte dental en jugo de fruta fortificado con Ca (1000 mg/L) en comparación con el jugo sin fortificar [116]. Otro estudio confirmó que mayor concentración de Ca en la leche fermentada se asocia con mayor prevención de erosión dental [117]. Se ha demostrado que la BEBIDA no tiene efecto desmineralizante sobre el esmalte dental bovino, a pesar de tener un pH ácido. Esto fue verificado mediante la razón de desmineralización, la liberación de Ca del esmalte y el análisis de imágenes MEB. El modelo aplicado evalúa la desmineralización del esmalte dental, permite el uso de dientes uniformes y no implica el uso de dientes humanos. El tiempo de incubación podría mejorarse con el objetivo que sea más representativo de lo que ocurre en un individuo.

El kéfir de agua es un kéfir no lácteo preparado con una solución de sacarosa con o sin extractos de frutas fermentado por granos de kéfir, que consiste en un consorcio de levaduras, principalmente *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* y BAL, incluidos los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* [118]. El CAA aún no cuenta con criterios microbiológicos específicos para el kéfir de agua, por este motivo en este trabajo se consideraron los enunciados para el kéfir de leche. Los ensayos realizados indicaron que la BEBIDA cumple con los criterios microbiológicos establecidos por el CAA, ya que se determinó un recuento de BAL en

el orden  $10^7$  UFC/mL (siendo el mínimo recomendado  $10^7$ ) y el recuento de levaduras en el orden  $10^6$  UFC/mL (siendo el mínimo recomendado  $10^4$ ). Asimismo, se identificaron *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus paracasei* (especie *Generally Recognized as Safe*). Por otro lado, la ausencia de coliformes totales, coliformes fecales, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp nos permitió evaluar la seguridad alimentaria, indicando ausencia de potenciales patógenos alimentarios. Se ha sospechado o confirmado que los brotes de enfermedades asociadas con el consumo de jugo fueron causados por una variedad de patógenos diferentes, incluyendo *E. coli* O157: H7, otras *E. coli* productoras de toxina Shiga, varios serotipos de *Salmonella* entérica y *C. parvum*. En los últimos años, los datos de las investigaciones de brotes y de laboratorio sugieren que muchos de estos patógenos pueden sobrevivir en el jugo durante períodos prolongados. Sharma y col. estudiaron la supervivencia de *Salmonella* en jugo de naranja fortificado con Ca (pH 3.96 a 4.19) mantenido a 4 °C durante 32 días y encontraron que la forma de sal de Ca afecta la tasa de inactivación. *Salmonella* Poona aumentó en  $10^5$  UFC/mL en jugo de melón (pH 6.3) almacenado a 20 °C durante 24 h y en  $10^8$  UFC/mL en 48 h, y *Salmonella* Baildon creció bien en jugo de tomate (pH 4.8). Quizás una combinación de disminución de la acidez de las frutas utilizadas para hacer jugo y una mayor tolerancia al ácido de algunas cepas de patógenos ha contribuido a un aumento de los brotes asociados con el jugo [119]. Un estudio investigó sobre un brote de salmonelosis en EE. UU, hallando que el jugo de naranja no pasteurizado de la empresa X fue el vehículo del mismo [120]. En respuesta a varios brotes de enfermedades en la década de 1990 asociados con jugos crudos procesados en instalaciones comerciales, la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) introdujo una regulación que exige que todas los jugos vendidos al por mayor se produzcan bajo un Análisis de Peligros y Plan de Puntos

Críticos de Control [121].

Según el ensayo sensorial realizado, la BEBIDA tuvo una media de aceptabilidad de 3.7 de una escala hedónica de 5 puntos. Un 58% de la muestra respondió que le gustó y un 75% indicó que sí la consumiría. Por otro lado, a partir de los resultados del análisis de penalización, se concluye que para mejorar la aceptabilidad de la BEBIDA se deberían optimizar los parámetros acidez y sabor a naranja. Un trabajo exploró el uso de jugos de frutas mediterráneos para desarrollar bebidas fermentadas no lácteas, utilizando kéfir. La evaluación de calidad general indicó que, entre los jugos de frutas mediterráneos probados, las bebidas de manzana y uva fueron las más aceptadas por los panelistas no entrenados [118]. Otro estudio evaluó la aceptabilidad de kéfir fermentado con pulpa de cacao y halló que la bebida fermentada a 10 °C durante 48 h y 72 h fue la más aceptada, lo que está relacionado a la producción de metabolitos, acidez y baja concentración de alcohol [122].

El desarrollo de bebidas fermentadas a base de jugo de frutas con kéfir puede ser percibido por los consumidores como saludable [118]. Se analizaron los consumidores de kéfir, ya que es uno de los ingredientes claves de la BEBIDA. Un 14.4% de la muestra analizada fueron consumidores de kéfir, principalmente kéfir de agua más frutas, con una frecuencia de consumo semanal y consumido, en primer lugar, por salud y bienestar. Un 46.3% lo conoció a través de amistades, un 24.3% a través de profesionales de la salud, un 26.8% por redes sociales y un 2.4% por un vendedor. Resultaría interesante investigar qué profesionales de la salud y ante qué situaciones recomiendan el consumo de kéfir. El consumo de kéfir se asocia con diversos beneficios nutracéuticos, que incluyen efectos antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos, antimicrobianos, antidiabéticos, antihipertensivos y antihipercolesterolémicos. Además, el kéfir se puede adaptar a diferentes sustratos

que permiten la producción de nuevas bebidas funcionales para proporcionar diversidad de productos. Al ser seguro y económico, existe interés mundial en el potencial nutricional del kéfir [123].

## 6 Conclusiones

El objetivo general de la tesis fue estudiar la biodisponibilidad de Ca y evaluar sensorialmente una bebida desarrollada en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo. A continuación se enuncian las conclusiones finales de acuerdo a los objetivos específicos planteados.

1. Se estandarizó el mecanismo de preparación de una bebida en base a jugo de naranja, kéfir y cáscara de huevo, cuya formulación final se denominó BEBIDA, logrando un aporte de Ca de 180 mg por porción.

2. Se determinó la biodisponibilidad de Ca de la BEBIDA mediante un modelo *ex vivo*, hallando que la absorción de Ca de ésta es mayor que en los grupos controles.

3. Se evaluó el efecto de la BEBIDA sobre el esmalte dental bovino mediante un análisis cuantitativo (razón de desmineralización y diferencia de Ca) y un análisis cualitativo (imágenes MEB), y se halló (por los 3 métodos) que difiere del ácido láctico (control positivo de desmineralización).

4. Se evaluó la composición microbiológica de la BEBIDA, identificando *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus paracasei*, con un recuento dentro de lo permitido por el CAA. Además se demostró ausencia de coliformes totales, coliformes fecales, de *Staphylococcus aureus* y de *Salmonella* spp, indicando ausencia de patógenos alimentarios y, por lo tanto, respetando el concepto de seguridad alimentaria.

5. Se evaluó la aceptabilidad de consumo de la BEBIDA en seres humanos a través de una prueba sensorial de grado de satisfacción (escala hedónica de 5 puntos) y una escala JAR para los atributos: sabor naranja, dulce y ácido. La media de aceptabilidad fue de 3.7, el 75% de la muestra analizada dijo que la consumiría y el

sabor ácido fue considerado ideal por la mayoría.

6. Se evaluó y describió el perfil de los consumidores de kéfir por ser uno de los ingredientes claves de la BEBIDA. Se halló que un 14.4% de la muestra analizada son consumidores de kéfir, especialmente de kéfir de agua más azúcar y frutas. El consumidor de kéfir presenta el siguiente perfil: mediana de edad=29 años, dedica más de cuatro horas diarias a preparar y consumir los alimentos, tiene una frecuencia de consumo semanal, su ocupación está en relación con el área salud y el motivo principal de su consumo es por bienestar y salud.

Los resultados de esta tesis indican que la BEBIDA es un método seguro, práctico y aceptable para mejorar la ingesta de Ca en la dieta. La BEBIDA tiene ciertas características que merecen ser destacadas: alta biodisponibilidad de Ca, posibilidad de preparación en el hogar y aprovechamiento de un residuo doméstico. Además, la BEBIDA no contiene leche, lo que la hace útil para aquellas personas que por diversas razones no pueden consumir productos lácteos.

## 7 Bibliografía

- [1] K. Li *et al.*, “The good, the bad, and the ugly of calcium supplementation: A review of calcium intake on human health,” *Clinical Interventions in Aging*, vol. 13., pp. 2443–2452, 2018.
- [2] J. M. Belizan, “Reduction of Blood Pressure With Calcium Supplementation in Young Adults,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 249, no. 9, pp. 1161, 1983.
- [3] J. M. Belizán, J. Villar, and J. Repke, “The relationship between calcium intake and pregnancy-induced hypertension: Up-to-date evidence,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 158, no. 4, pp. 898–902, 1988.
- [4] T. Waldman, R. Sarbaziha, C. Noel Bairey Merz, and C. Shufelt, “Calcium supplements and cardiovascular disease: A review,” *Am. J. Lifestyle Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 298–307, 2015.
- [5] Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, “Guías alimentarias para la población Argentina,” *Guías Aliment. para la población Argentina*, pp. 100–103, 2016.
- [6] F. Cámara-Martos and M. A. Amaro-López, “Influence of dietary factors on calcium bioavailability: A brief review,” *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 89, no. 1, pp. 43–52, 2002.
- [7] M. Shimizu, “Food-derived peptides and intestinal functions,” *BioFactors*, vol. 21, no. 1–4, pp. 43–47, 2004.
- [8] L. Wang *et al.*, “Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination,” *Food Chem.*, vol. 239, pp. 416–426, 2018.
- [9] J. K. Hodges, S. Cao, D. P. Cladis, and C. M. Weaver, “Lactose intolerance and bone health: The challenge of ensuring adequate calcium intake,” *Nutrients*, vol. 11, no. 4, 2019.
- [10] P. Etcheverry, M. A. Grusak, and L. E. Fleige, “Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B 6, B 12, D, and E,” *Frontiers in Physiology*, vol. 3, pp. 317, 2012.
- [11] R. P. Heaney, “Calcium, Dairy Products and Osteoporosis,” *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 19, pp. 83-99, 2000.
- [12] S. Gonnelli *et al.*, “Accuracy of different reduced versions of validated food-frequency questionnaire in Italian men and women,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 85,

- no. 3, pp. 221–227, 2009.
- [13] N. Silanikove, G. Leitner, and U. Merin, “The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: Global perspectives in evolutionary and historical backgrounds,” *Nutrients*, vol. 7, no. 9, pp. 7312–7331, 2015.
- [14] L. Allen, B. De Benoist, O. Dary, and R. Hurrell, “Guidelines on food fortification with micronutrients Food and Agricultural Organization of the United Nations Guidelines on food fortification with micronutrients”, 2019.
- [15] M. C. E. Lomer, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, “Review article: Lactose intolerance in clinical practice - Myths and realities,” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 27, no. 2, pp. 93–103, 2008.
- [16] F. Fassio, M. Facioni, and F. Guagnini, “Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives,” *Nutrients*, vol. 10, no. 11, pp. 1599, 2018.
- [17] T. A. Nicklas *et al.*, “Self-perceived lactose intolerance results in lower intakes of calcium and dairy foods and is associated with hypertension and diabetes in adults,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 94, no. 1, pp. 191–198, 2011.
- [18] R. Argentina, “Valorización mensual de la canasta básica alimentaria y de la canasta básica total. Gran Buenos Aires Instituto Nacional de Estadística y Censos,” *Inf. técnicos*, vol. 5, pp. 72, 2021.
- [19] C. Villa-Etchegoyen, M. Lombarte, N. Matamoros, J. M. Belizán, and G. Cormick, “Mechanisms involved in the relationship between low calcium intake and high blood pressure,” *Nutrients*, vol. 11, no. 5, 2019.
- [20] G. Cormick and J. M. Belizán, “Calcium intake and health,” *Nutrients*, vol. 11, no. 7, 2019.
- [21] Profamilia, “Encuesta Nacional de Demografía y Salud,” 2015. [http://www.profamilia.org.co/encuestas/Profamilia/Profamilia/documentos/boletines/prensa/Situacion\\_de\\_los\\_Ninos\\_y\\_Ninas\\_en\\_Colombia.pdf](http://www.profamilia.org.co/encuestas/Profamilia/Profamilia/documentos/boletines/prensa/Situacion_de_los_Ninos_y_Ninas_en_Colombia.pdf).
- [22] E. Por, L. Allen, B. De Benoist, O. Dary, and R. Hurrell, “Guías para la fortificación de alimentos con micronutrientes”.
- [23] R. Unificado *et al.*, “Preguntas más frecuentes,” pp. 2010–2011, 2011.
- [24] López L, Suárez M. *Fundamentos de nutrición normal*. 1a edición. Buenos Aires: El ateneo, 2002.
- [25] “WHO | Vitamin and mineral requirements in human nutrition,” *WHO*, 2018.
- [26] Blanco A. *Química Biológica*. 8a edición. Buenos Aires: El Ateneo, 2006.

- [27] J. A. Olson, "Calcium Requirements and Recommended Dietary Allowances," *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 31, pp. S1–S6, 1985.
- [28] A. E. Kralick and B. S. Zemel, "Evolutionary Perspectives on the Developing Skeleton and Implications for Lifelong Health," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 11., pp. 99, 2020.
- [29] A. C. Ross *et al.*, "The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: What Dietetics Practitioners Need to Know," *J. Am. Diet. Assoc.*, vol. 111, no. 4, pp. 524–527, 2011.
- [30] "Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes, Elements, Food and Nutrition Board, National Academies," 2019.
- [31] L. R. Brun, M. L. Brance, M. Lupo, and A. Rigalli, "Relevamiento del contenido de calcio en lácteos de uso masivo," *Actual. osteol.*, vol. 8, no. 3, pp. 158–163, 2012.
- [32] "Vademecum Nutrinfo." <https://www.nutrinfo.com/vademecum>.
- [33] M. Elena Torresani, "Enfoque nutricional en la prevención de la osteoporosis," *Actual. osteol*, vol 2, no. 2, pp.76-80, 2007.
- [34] V. A. Areco, R. Kohan, G. Talamoni, N. G. Tolosa De Talamoni, and M. E. Peralta López, "Intestinal Ca<sup>2+</sup>absorption revisited: A molecular and clinical approach," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 26, no. 24, pp. 3344–3364, 2020.
- [35] L. R. Brun, M. L. Brance, M. Lombarte, M. Lupo, V. E. Di Loreto, and A. Rigalli, "Regulation of intestinal calcium absorption by luminal calcium content: Role of intestinal alkaline phosphatase," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 58, no. 7, pp. 1546–1551, 2014.
- [36] G. Diaz De Barboza, S. Guizzardi, and N. Tolosa De Talamoni, "Molecular aspects of intestinal calcium absorption," *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 23, pp. 7142–7154, 2015.
- [37] V. Areco, M. A. Rivoira, V. Rodriguez, A. M. Marchionatti, A. Carpentieri, and N. T. De Talamoni, "Dietary and pharmacological compounds altering intestinal calcium absorption in humans and animals," *Nutr. Res. Rev.*, vol. 28, no. 2, pp. 83–99, 2015.
- [38] R. H. Wasserman, "Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption," *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 11, pp. 3137–3139, 2004.
- [39] A. V. Pérez, G. Picotto, A. R. Carpentieri, M. A. Rivoira, M. E. Peralta López, and N. G. Tolosa de Talamoni, "Minireview on Regulation of Intestinal Calcium Absorption," *Digestion*, vol. 77, no. 1, pp. 22–34, 2008.

- [40] V. Rodríguez, M. Rivoira, A. Marchionatti, A. Pérez, and N. Tolosa De Talamoni, "Ursodeoxycholic and deoxycholic acids: A good and a bad bile acid for intestinal calcium absorption," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 540, no. 1–2, pp. 19–25, 2013.
- [41] N. Sun *et al.*, "Food protein-derived calcium chelating peptides: A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 58, pp. 140–148, 2016.
- [42] L. Křížová, K. Dadáková, J. Kašparovská, and T. Kašparovský, "Isoflavones," *Molecules*, vol. 24, no. 6, 2019.
- [43] C. Castelo-Branco and M. J. Cancelo Hidalgo, "Isoflavones: Effects on bone health," *Climacteric*, vol. 14, no. 2, pp. 204–211, 2011.
- [44] M. Pabich and M. Materska, "Biological effect of soy isoflavones in the prevention of civilization diseases," *Nutrients*, vol. 11, no. 7, 2019.
- [45] H. J. Wang and P. A. Murphy, "Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, no. 8, pp. 1674–1677, 1994.
- [46] C. M. WEAVER, R. P. HEANEY, K. P. NICKEL, and P. I. PACKARD, "Calcium Bioavailability from High Oxalate Vegetables: Chinese Vegetables, Sweet Potatoes and Rhubarb," *J. Food Sci.*, vol. 62, no. 3, pp. 524–525, 1997.
- [47] R. P. Heaney, C. M. Weaver, and R. R. Recker, "Calcium absorbability from spinach," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 47, no. 4, pp. 707–709, 1988.
- [48] R. P. Heaney, C. M. Weaver, and M. L. Fitzsimmons, "Soybean phytate content: effect on calcium absorption," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 53, no. 3, pp. 745–747, 1991.
- [49] M. Lucarini, R. Canali, M. Cappelloni, G. Di Lullo, and G. Lombardi-Boccia, "In vitro calcium availability from brassica vegetables (*Brassica oleracea* L.) and as consumed in composite dishes," *Food Chem.*, vol. 64, no. 4, pp. 519–523, 1999.
- [50] A. Kamchan, P. Puwastien, P. P. Sirichakwal, and R. Kongkachuichai, "In vitro calcium bioavailability of vegetables, legumes and seeds," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 17, no. 3–4, pp. 311–320, 2004.
- [51] S. J. J. Debon and R. F. Tester, "In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides," *Food Chem.*, vol. 73, no. 4, pp. 401–410, 2001.
- [52] J. G. S. Silva, A. P. Rebellato, E. T. dos S. Caramês, R. Greiner, and J. A. L. Pallone, "In vitro digestion effect on mineral bioaccessibility and antioxidant bioactive compounds of plant-based beverages," *Food Res. Int.*, vol. 130, pp. 108–993, 2020.

- [53] S. Chalupa-Krebzdak, C. J. Long, and B. M. Bohrer, "Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives," *International Dairy Journal*, vol. 87, pp. 84–92, 2018.
- [54] Rigalli A, Ferrer A, Balmaceda G, Lupo M, Chulibert ME. "Química Biológica para las Ciencias Biomédicas Textos & Vídeos,". Alfredo Rigalli, 2018.
- [55] Y. J. Bae and J. Kratzsch, "Vitamin D and calcium in the human breast milk," *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 32, no. 1, pp. 39–45, Jan. 01, 2018.
- [56] J. Allgrove, "Physiology of Calcium, Phosphate, Magnesium and Vitamin D," in *Endocrine Development*, vol. 28, pp. 7–32, 2015.
- [57] "LCT - Lactase-phlorizin hydrolase precursor - Homo sapiens (Human) - LCT gene & protein." <https://www.uniprot.org/uniprot/P09848> (accessed Jun. 10, 2021).
- [58] L. C. Olds and E. Sibley, "Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: Functional role as a cis regulatory element," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 12, no. 18, pp. 2333–2340, 2003.
- [59] A. M. Bosch, "Classical galactosaemia revisited," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 29, no. 4, pp. 516–525, 2006.
- [60] J. B. Holton, M. G. Gillett, R. MacCaul, and R. Young, "Galactosaemia: A new severe variant due to uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency," *Arch. Dis. Child.*, vol. 56, no. 11, pp. 885–887, 1981.
- [61] M. Asada, Y. Okano, T. Imamura, I. Suyama, Y. Hase, and G. Isshiki, "Molecular characterization of galactokinase deficiency in Japanese patients," *J. Hum. Genet.*, vol. 44, no. 6, pp. 377–382, 1999.
- [62] C. J. Vorland, E. R. Stremke, R. N. Moorthi, and K. M. Hill Gallant, "Effects of Excessive Dietary Phosphorus Intake on Bone Health," *Current Osteoporosis Reports*, vol. 15, no. 5, pp. 473–482, 2017.
- [63] U. Trautvetter, B. Ditscheid, G. Jahreis, and M. Gleib, "Habitual intakes, food sources and excretions of phosphorus and calcium in three German study collectives," *Nutrients*, vol. 10, no. 2, 2018.
- [64] M. S. Calvo and J. Uribarri, "Contributions to Total Phosphorus Intake: All Sources Considered," *Semin. Dial.*, vol. 26, no. 1, pp. 54–61, 2013.
- [65] Ministerios de Salud Presidencia de la Nación de la República Argentina, "Encuesta Nacional de Nutrición y Salud," 2019.
- [66] Gil A. Tratado de Nutrición. *Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. 2a edición. España: Panamericana, 2010.

- [67] L. R. Brun, M. Lupo, D. A. Delorenzi, V. E. Di Loreto, and A. Rigalli, "Chicken eggshell as suitable calcium source at home," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 64, no. 6, pp. 740–743, 2013.
- [68] Ministerio de Producción y Trabajo, "Alimentos fortificados y enriquecidos: ¿Dónde están las diferencias?," *Aliment. Argentinos*, pp. 3, 2014.
- [69] Instituto Nacional del alimento. ANMAT, "Capítulo XVII. Alimentos de regimen o dietéticos," 2017.
- [70] G. J. Hofmeyr, T. A. Lawrie, Á. N. Atallah, and M. R. Torloni, "Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2018.
- [71] J. A. Kanis, C. Cooper, R. Rizzoli, and J. Y. Reginster, "European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women," *Osteoporos. Int.*, vol. 30, no. 1, pp. 3–44, 2019.
- [72] J. Bartter *et al.*, "Use of chicken eggshell to improve dietary calcium intake in rural sub-Saharan Africa," *Matern. Child Nutr.*, vol. 14, pp. e12649, 2018.
- [73] M. Waheed *et al.*, "Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 91, pp. 219–230, 2019.
- [74] S. Ray, A. Kumar Barman, P. Kumar Roy, and B. Kumar Singh, "The Pharma Innovation Journal 2017; 6(9): 01-04 Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes," 2017.
- [75] G. Lesnierowski and J. Stangierski, "What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 71, pp. 46–51, 2018.
- [76] N. Omi and I. Ezawa, "Effect of Egg-Shell Ca on Preventing of Bone Loss after Ovariectomy," 1998.
- [77] Schaafsma A.\*, J. J. van Doormaal, F. A. J. Muskiet, G. J. H. Hofstede, I. Pakan, and E. van der Veer, "Positive effects of a chicken eggshell powder-enriched vitamin–mineral supplement on femoral neck bone mineral density in healthy late post-menopausal Dutch women," *Br. J. Nutr.*, vol. 87, no. 3, pp. 267–275, 2002.
- [78] Y. Masuda, "Hen's eggshell calcium.," *Clinical calcium*, vol. 15, no. 1. pp. 95–100, 2005.
- [79] W. Daengprok, W. Garnjanagoonchorn, O. Naivikul, P. Pornsinlpatip, K. Issigonis, and Y. Mine, "Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 20, pp. 6056–6061, 2003.

- [80] W. Siemiradzka, B. Dolinska, and F. Ryszka, "New Sources of Calcium (Chicken Eggshells, Chelates) - Preparation of Raw Material and Tablets," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 19, no. 7, pp. 566–572, 2018.
- [81] S. El-Shibiny, M. A. E.-K. M. A. El-Gawad, F. M. Assem, and S. M. El-Sayed, "The use of nano-sized eggshell powder for calcium fortification of cow's and buffalo's milk yogurts," *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, vol. 17, no. 1, pp. 37–49, 2018.
- [82] B. L. Fina, L. R. Brun, and A. Rigalli, "Increase of calcium and reduction of lactose concentration in milk by treatment with kefir grains and eggshell," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 67, no. 2, pp. 133–140, 2016.
- [83] M. L. Marco *et al.*, "Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 44. Elsevier Ltd, pp. 94–102, 2017.
- [84] S. N. Chilton, J. P. Burton, G. Reid, and G. Reid, "Inclusion of fermented foods in food guides around the world," *Nutrients*, vol. 7, no. 1, pp. 390–404, 2015.
- [85] S. Ebner, L. N. Smug, W. Kneifel, S. J. Salminen, and M. E. Sanders, "Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 43, pp. 16095–16100, 2014.
- [86] A. R. Lucas R.M Brun, María L. Brance, Lucas F. de Candia, "Intestinal Everted Sacs," in *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*, V. E. D. L. Alfredo Rigalli, Ed. 2009.
- [87] C. Council on Animal Care, "Guide to the care and use of experimental animals, volume 2," *Can. J. Comp. Med.*, vol. 49, no. 1, pp. 49, 1985.
- [88] G. F. Ferrazzano, T. Cantile, M. Quarto, A. Ingenito, L. Chianese, and F. Addeo, "Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro," *Aust. Dent. J.*, vol. 53, no. 4, pp. 314–319, 2008.
- [89] Código Alimentario Argentino, "Capítulo VIII – Alimentos Lácteos," *Código Aliment. Argentino*, pp. 323–416, 2006.
- [90] A. Ferrari, G. Vinderola, R. Weill. *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura*. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Danone del Cono Sur, 2020.
- [91] E. Dimidi, S. R. Cox, M. Rossi, and K. Whelan, "Fermented foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease," *Nutrients*, vol. 11, no. 8, 2019.
- [92] D. Laureys, A. Van Jean, J. Dumont, and L. De Vuyst, "Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 7, pp. 2811–2819, 2017.

- [93] Secretaria de agroindustria de Argentina, “Kéfir: Una nueva forma de consumir lácteos,” 2015.
- [94] D. D. Rosa, M. M. S. Dias, Ł. M. Grześkowiak, S. A. Reis, L. L. Conceição, and M. D. C. G. Peluzio, “Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits,” *Nutrition Research Reviews*, vol. 30, no. 1, pp. 82–96, 2017.
- [95] D. H. Kim, J. W. Chon, H. Kim, and K. H. Seo, “Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 24, no. 4, pp. 1397–1403, 2015.
- [96] J.-R. Liu, S.-Y. Wang, M.-J. Chen, H.-L. Chen, P.-Y. Yueh, and C.-W. Lin, “Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters,” *Br. J. Nutr.*, vol. 95, no. 5, pp. 939–946, 2006.
- [97] J.-R. Liu, S.-Y. Wang, M.-J. Chen, P.-Y. Yueh, and C.-W. Lin, “The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 86, no. 15, pp. 2527–2533, 2006.
- [98] J. Miao *et al.*, “Antibacterial Effects of a Cell-Penetrating Peptide Isolated from Kefir,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 16, pp. 3234–3242, 2016.
- [99] M. Sharifi, A. Moridnia, D. Mortazavi, M. Salehi, M. Bagheri, and A. Sheikhi, “Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties,” *Medical Oncology*, vol. 34, no. 11, 2017.
- [100] N. Khoury, S. El-Hayek, O. Tarras, M. El-Sabban, M. El-Sibai, and S. Rizk, “Kefir exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion,” *Int. J. Oncol.*, vol. 45, no. 5, pp. 2117–2127, 2014.
- [101] R. C. Witthuhn, T. Schoeman, and T. J. Britz, “Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation,” *Int. Dairy J.*, vol. 15, no. 4, pp. 383–389, 2005.
- [102] F. A. Fiorda *et al.*, “Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review,” *Food Microbiology*, vol. 66, pp. 86–95, 2017.
- [103] S. Sethi, S. K. Tyagi, and R. K. Anurag, “Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 53, no. 9. Springer India, pp. 3408–3423, 2016.
- [104] Verdú JM. *Nutrición y Alimentación Humana*. 2a Edición. España: Océano/ergon, 2009.
- [105] G. Nieto, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez, R. Peñalver, G. Ros, and M. Viuda-Martos, “Valorization of Citrus Co-Products: Recovery of Bioactive Compounds and Application in Meat and Meat Products,” *Plants*, vol. 10, no. 6, 2021.

- [106] J. H. Roe, "A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine," *J. Biol. Chem.*, vol. 107, no. 1, pp. 15–22, 1934.
- [107] R development Core Team, "R: A Language and Environment for Statistical Computing." R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.
- [108] G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras. *Atlas of clinical fungi*. 2a edición. Centralbureau voor Schimmelcultures/Universtat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2002.
- [109] M. Reyna and L. Domínguez, "Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos." Lima, 2007.
- [110] B. M. Watts, G. L. Ylimaki, L. E. Jeffert, and L. G. Elías, *Métodos Sensoriales Básicos para la Evaluación de Alimentos*, vol. 1, 1992.
- [111] M. Batista et al., "Nutrient content of homemade almond beverages," *Actual. Nutr.*, vol. 16, no. 1, pp. 12-17, 2015.
- [112] A. Sousa and K. A. Kopf-Bolanz, "Nutritional Implications of an Increasing Consumption of Non-Dairy," 2017.
- [113] W. J. Craig and U. Fresán, "International analysis of the nutritional content and a review of health benefits of non-dairy plant-based beverages," *Nutrients*, vol. 13, no. 3, pp. 1–14, 2021.
- [114] S. Singhal, R. D. Baker, and S. S. Baker, "A Comparison of the Nutritional Value of Cow's Milk and Nondairy Beverages," *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 64, no. 5, pp. 799–805, 2017.
- [115] L. Vannucci et al., "Calcium Intake in bone health: A focus on calcium-rich mineral waters," *Nutrients*, vol. 10, no. 12, 2018.
- [116] S. Franklin, S. Masih, and A. M. Thomas, "An in-vitro assessment of erosive potential of a calcium-fortified fruit juice," *Eur. Arch. Paediatr. Dent.*, vol. 15, no. 6, pp. 407–411, 2014.
- [117] K. H. Kim et al., "A study of dental erosion prevention by calcium contents of fermented milk," *J Korean Soc Dent Hyg*, vol. 17, no. 6, pp. 969–81, 2017, doi: 10.13065/jksdh.2017.17.06.969.
- [118] W. Randazzo et al., "Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms," *Food Microbiol.*, vol. 54, pp. 40–51, 2016.
- [119] S. Jain et al., "Multistate Outbreak of Salmonella Typhimurium and Saintpaul Infections Associated with Unpasteurized Orange Juice-United States, 2005," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 48, no. 8, pp. 1065–1071, 2009.
- [120] J. D. Vojdani, L. R. Beuchat, and R. V. Tauxe, "Juice-associated outbreaks of

- human illness in the United States, 1995 through 2005,” *J. Food Prot.*, vol. 71, no. 2, pp. 356–364, 2008.
- [121] M. D. Danyluk, R. M. Goodrich-Schneider, K. R. Schneider, L. J. Harris, and R. W. Worobo, “Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Fruit and Vegetable Juices,” *Univ. Florida IFAS Ext*, pp. 1–7, 2012.
- [122] C. Puerari, K. Teixeira Magalhães, and R. Freitas Schwan, “New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis,” *FRIN*, vol. 48, pp. 634–640, 2012.
- [123] N. F. Azizi *et al.*, “Kefir and its biological activities,” *Foods*, vol. 10, no. 6, 2021.
- [124] M. E. Chulibert *et al.*, “Estimación de la ingesta de calcio y fósforo a partir de bebidas analcohólicas,” *Actual. Osteol*, vol. 17, no. 1, 2021. En prensa.
- [125] Código Alimentario Argentino, “Capítulo V – Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos,” *Código Aliment. Argentino*, pp. 44, 2005.

## 8 Anexos

### 8.1 Control de calidad de agua potable

**Tabla 21.** Informe de laboratorio: análisis de agua

Determinaciones	Valor	Máximo aceptado
pH	7.0±0.5	6.5-8.5
Conductividad (mS/cm)	0.29±0.06	
Dureza (ppm)	62.4±3.3	100-500
Sodio (ppm)	62.4±3.3	200
Cloruro (ppm)	32.2±10.6	250
Sulfato (ppm)	47.63±19.37	200
Nitrato (ppm)	1.84±0.7	45
Calcio (ppm)	12.48±3.8	250
Fluoruro (ppm)	0.11±0.04	1.5
Sólidos Totales (ppm)	271.25±57.5	1000
Alcalinidad Total (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	54.77±19,42	30-200
Fosfato (ppm)	0	3.5
Arsénico (ppm)	0.001	0.05
Turbidez (UNT)	<1	1

*El agua cumple con las características químicas impuestas por la legislación vigente. Centro Universitario de Estudios Medioambientales. Facultad de Ciencias Médicas.*

## 8.2 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo, excepto los casos indicados, se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### *Agua peptonada*

Peptona	1 g
Agua destilada	1 L
pH = 6.8 ± 0.1	

### *Agar Plate Count*

Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
pH = 7.0 ± 0.1	

### *Agar Manosa, Sharpe and Rogos*

Proteasa peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Monoleato de sorbitán	1 mL
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Agar	13 g

pH = 6.4 ± 0.2

*Agar Violeta Rojo Bilis Lactosa*

Extracto de levadura	3 g
Peptona	7 g
Sales biliares	1.5 g
Lactosa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

pH = 7.4 ± 0.2

Llevar a ebullición durante 1 min. **No esterilizar en autoclave.**

*Agar LEVINE*

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato de potasio	2 g
Agar	15 g
Eosina	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
pH = 7.1 ± 0.2	

*Agar Baird Parker*

Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro de litio	5 g
Glicina	12 g
Piruvato de sodio	10 g

---

Agar	17 g
------	------

Agua destilada	1 L
----------------	-----

pH =  $6.8 \pm 0.2$ .

Esterilizar, enfriar a 45 °C y agregar 45 mL de emulsión de yema de huevo y 10 mL de solución de telurito.

#### *Agar DNasa*

Tripteína	20 g
-----------	------

Ácido desoxirribonucleico	2 g
---------------------------	-----

Cloruro de sodio	5 g
------------------	-----

Agar	15 g
------	------

Agua destilada	1 L
----------------	-----

pH =  $7.3 \pm 0.2$

#### *Caldo lactosado*

Extracto de carne	3 g
-------------------	-----

Peptona	5 g
---------	-----

Lactosa	5 g
---------	-----

Agua destilada	1 L
----------------	-----

pH =  $6.9 \pm 0.2$

#### *Caldo Rappaport Vassiliadis con soja*

Peptona de soja	4.5 g
-----------------	-------

Cloruro de magnesio 6H <sub>2</sub> O	29 g
---------------------------------------	------

Cloruro de sodio	8 g
------------------	-----

Fosfato monoácido de potasio	0.4 g
------------------------------	-------

Fosfato diácido de potasio	0.6 g
----------------------------	-------

Verde de malaquita	0.036 g
--------------------	---------

Agua destilada	1 L
----------------	-----

pH =  $5.2 \pm 0.1$

*Caldo Tetrionato*

Peptona	5 g
Sales biliares	1 g
Carbonato de calcio	10 g
Tiosulfato de sodio	30 g
Agua destilada	1 L

*Solución yodo-ioduro de potasio*

Ioduro de potasio	5 g
Yodo resublimado	1 g
Agua destilada	1 L

Llevar a ebullición, enfriar a 45°C y agregar 20 mL de solución iodada. Mezclar y distribuir 10 mL por tubo. No debe calentarse luego de agregar la solución iodada. **No autoclavar.** El medio base debe mantenerse a 4 °C y una vez agregada la solución iodada debe utilizarse en el mismo día.

*Agar Verde Brillante*

Pluripeptona	10 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Rojo fenol	0.08 g
Verde brillante	0.0125 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

*Agar de Xilosa- Lisina- Desoxicolato*

Xilosa	3.5 g
Lisina	5 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de levadura	3 g
Rojo fenol	0.08 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g
Tiosulfato sódico	6.8 g
Citrato férrico de amonio	0.8 g
Agar	13 g
Agua destilada	1 L
pH = 7.4 ± 0.2 a 25°C.	
Llevar a ebullición. <b>No autoclavar.</b>	

*Agar sabouraud glucosa*

Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L
pH = 5.6	

*CHROMagar-Candida*

Cromopeptona	10 g
Glucosa	20 g
Mezcla cromogénica	2 g
Cloranifenicol	0.5 g
Agar	15 g
pH = 6.0 ± 0.3	

*Agar Leche*

Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.50 g
Dextrosa	1 g
Leche en polvo desnatada	1 g
Agar-agar	10 g
Agua destilada	1 L
pH = 6.9 ± 0.2	

*Azul de lactofenol*

Ácido láctico	100 g
Sudán III	0.10 g
Azul de algodón	0.10 g
Solución alcohólica de Yodo	10-20 gotas

**8.3 Tinción Gram-Nicolle**

*Preparación del extendido:* se extiende una colonia bacteriana sobre un portaobjetos (limpio, desengrasado y seco) con una gota de agua y se fija en la llama.

*Tinción:* colocar el primer colorante (violeta de genciana) y dejar en contacto 1 minuto. Lavar con agua, eliminando el exceso de colorante. Luego, añadir lugol y mantener en contacto durante un 1 minuto. Nuevamente lavar con agua y tratar con alcohol-acetona durante 10 s. Lavar con agua y añadir safranina durante 1 minuto (colorante de contraste). Dejar secar y proceder a la observación bajo microscopio óptico con aceite de inmersión. Interpretación: bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta y las bacterias Gram negativas de color rosado intenso.

## 8.4 Pruebas bioquímicas

### 8.4.1 Catalasa

La catalasa es una hemoproteína similar en estructura a la hemoglobina. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos. Si se acumula  $H_2O_2$  es letal para las células bacterianas. Dicha enzima cataliza la reacción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  (evidenciándose por burbujas de gas).

Agregar 1 a 2 gotas de  $H_2O_2$  al 3% a la colonia en estudio sobre a la superficie de un portaobjetos. La aparición y sostenida producción de burbujas de gas indican un resultado positivo.

### 8.4.2 Citocromo oxidasa

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa. Los citocromos actúan como el último vínculo en la cadena respiratoria, transfiriendo electrones al  $O_2$  con la formación de  $H_2O$ .

Colocar la colonia de 18 a 24 h de desarrollo sobre la tira de papel impregnada con alfa-naftol y N, N-dimetil-p-fenilendiamina. La presencia de una coloración azul indica un resultado positivo y la ausencia de color, un resultado negativo.

### 8.4.3 Prueba en agar DNasa

El agar DNasa es un medio de cultivo utilizado para la detección de enzimas desoxirribonucleasas.

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, sembrar un inóculo denso por la técnica de spot e incubar en aerobiosis, durante 24-48 h a 35-37 °C.

Luego, cubrir la placa con HCl 1N. La observación de un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano constituye un resultado positivo.

## 8.5 Consentimiento informado

Solicitamos su colaboración en un estudio titulado **“Estudios de la biodisponibilidad de calcio y evaluación sensorial de una bebida desarrollada en base a jugos de frutas, kéfir y cáscara de huevo”**. Este estudio tiene como objetivo evaluar en voluntarios una bebida preparada por fermentación de jugos de frutas con gránulos de kéfir y fortificado con calcio. Los gránulos de kéfir son microorganismos similares a los utilizados en algunos lácteos que se consumen habitualmente como yogur. Cabe destacar que los gránulos de kéfir son de uso libre y se comercializan en nuestro mercado. El uso de kéfir es una técnica hogareña fácil y segura. Nuestro grupo de investigación está desarrollando una bebida fermentada con gránulos de kéfir con adición de cáscara de huevo como fuente de calcio y jugos de frutas.

Usted es invitado a participar de esta investigación. Ud. puede negarse a participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento, sin la necesidad de informar la razón de su decisión. Antes de que usted decida tomar parte en este estudio de investigación, es importante que lea, cuidadosamente, este documento. Los investigadores responsables de este proyecto discutirán con usted el contenido de este informe y le explicarán todos aquellos puntos en los que tenga dudas. Si después de haber leído toda la información usted decide participar de este estudio, deberá firmar este consentimiento en el lugar indicado. Usted recibirá una copia de este consentimiento informado.

Si Ud. decide participar del estudio deberá participar de una prueba sensorial de escala hedónica con una escala JAR, en la que será invitado a beber 20-50 mL de la bebida y responder a un formulario **si: a) le disgusta mucho, b) le disgusta, c) no le gusta ni le disgusta, d) le gusta, e) le gusta mucho**. Por otra parte, usted deberá completar según su percepción los siguientes atributos: sabor dulce, ácido y naranja. Por último responder a la pregunta si consumiría el producto.

Este estudio será gratuito y Ud. no deberá afrontar gasto alguno. Tampoco recibirá remuneración económica por su participación en este estudio.

Sus datos serán guardados en forma confidencial y su nombre no será revelado en ningún caso.

Yo,.....(DNI)

.....manifiesto que he sido informado de lo expresado más arriba y otorgo mi consentimiento de participar voluntariamente en la investigación titulada **“Estudios de la biodisponibilidad de calcio y evaluación sensorial de una bebida desarrollada en base a jugos de frutas, Kéfir y cáscara de huevo”**.

SI

NO

Nombre del investigador responsable: .....